

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina de Lisboa



**Avaliação da qualidade das amostras de biópsias  
líquidas de pacientes com tumores urológicos,  
colhidas e armazenadas no Biobanco-iMM, CAML**

Fabiana Cândida da Rocha Rodrigues

**Orientado por:** Prof. Doutor Sérgio Jerónimo Rodrigues Dias

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de  
Mestre em Oncobiologia

2019



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina de Lisboa



**Avaliação da qualidade das amostras de biópsias líquidas  
de pacientes com tumores urológicos, colhidas e  
armazenadas no Biobanco-iMM, CAML**

Fabiana Cândida da Rocha Rodrigues

**Orientado por:** Prof. Doutor Sérgio Jerónimo Rodrigues Dias

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de  
Mestre em Oncobiologia

2019



**A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da  
Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 21 de maio de 2019.**



## Agradecimentos

Sem sacrifício e trabalho duro nada se consegue. O caminho pode ter sido difícil, mas com empenho e a ajuda de pessoas fantásticas posso hoje dizer que atravesso mais uma meta na minha vida.

Assim, quero dedicar um sentido agradecimento a todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade, impedindo-me de desistir e ajudando e acompanhando-me durante toda esta fase. A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a vossa colaboração, estímulo e empenho.

Em primeiro lugar, e porque sempre estarão em primeiro lugar, quero agradecer à minha família, por não terem desistido de mim e me terem apoiado na fase mais difícil da minha vida, ajudando-me a reerguer e a continuar a luta do dia-a-dia.

Em segundo lugar, agradeço às minhas colegas do Biobanco-iMM que estiveram comigo nos bons e nos maus momentos, apoiando-me e cedendo-me todo o tempo necessário e todos os conhecimentos que tinham para a realização deste projeto. Um muito obrigado à Ângela por todo o tempo que dispensou, a mim e ao meu projeto e, principalmente, pelo ombro amigo que me ofereceu sempre que precisei.

Agradeço também ao Professor Doutor Sérgio Dias pela orientação, pelo tempo que dedicou a este projeto e pela confiança e liberdade de ação que permitiu que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal e científico, ensinando-me a pensar e a tomar decisões.

Por fim agradeço a todas as pessoas que contribuíram com o seu conhecimento e trabalho e me dispensaram algumas horas do seu tempo, permitindo o desenvolvimento deste projeto:

- Ao Doutor Ângelo Calado, do laboratório JEFonseca, pela simpatia, interesse, tempo e conhecimentos em qPCR;
- À Doutora Helena Cabaço, do Laboratório MPrudêncio, pela ajuda com o equipamento e *software* de qPCR;

- À Doutora Maria Soares, do laboratório JLacerda, e à Diana Macedo da Citometria de Fluxo, pela paciência e ajuda preciosa em citometria;

- Às Doutorãs Rita Moura e Rita Cascão por oferecerem os seus conhecimentos em estatística;

- Ao Dr. Tito Leitão e ao Dr. Afonso Castro pela disponibilidade e interesse demonstrado em criar e implementar um novo circuito de amostras para o Biobanco e por reunirem toda a informação clínica utilizada neste projeto.

- À Doutora Ana Magalhães, do laboratório SDias e às mestrandas Patrícia Lopes e Rita Gonçalves, por cederem linhas celulares para a otimização do painel de citometria;

- À Patrícia Correadeira, do laboratório LCosta, pelo tempo e partilha de conhecimentos sobre CTCs;

- E a todos aqueles que com menor envolvimento contribuíram para a realização deste projeto.

A todos os mais ou menos envolvidos, direta ou indiretamente, com conhecimentos, tempo ou amizade, os meus sinceros agradecimentos.



## Resumo

O Biobanco-iMM é uma estrutura sem fins lucrativos integrada no Centro Académico de Medicina de Lisboa (CAML). Criada em 2008 no Instituto de Medicina Molecular (iMM-JLA) tem como principal objetivo promover a investigação biomédica.<sup>1</sup>

A oncologia é umas das áreas de investigação mais ativas atualmente, nomeadamente na procura de novas terapêuticas e métodos de diagnóstico. Tendo isto em consideração, desenvolveu-se este projeto cujos objetivos foram avaliar a qualidade das biopsias líquidas existentes na coleção de Tumores e capacitar a coleção com novos recursos biológicos, de forma a ir de encontro às novas exigências da comunidade científica.

Para isso avaliou-se a estabilidade genómica do DNA armazenado, testando-se a pureza, integridade e a qualidade para aplicações *downstream*, isolou-se exossomas a partir de soro armazenado, avaliando-se posteriormente a sua qualidade, e testou-se a possibilidade de implementar um serviço de enriquecimento de células tumorais circulantes (CTCs).

Da avaliação da estabilidade do DNA apenas a pureza revelou alterações significativas ao longo do tempo de armazenamento, no entanto todas as amostras mantêm-se dentro dos padrões de qualidade, quer sob a forma de DNA quer sobre a forma de ST. O isolamento de exossomas a partir de soro armazenado revelou-se simples, no entanto com alguma contaminação. Os *arrays* realizados demonstraram a possibilidade de identificar marcadores específicos mesmo após armazenamento. Para a implementação do método de enriquecimento de CTCs testaram-se dois *kits* da *StemCell* revelando-se o RosettSep o método com resultados mais puros. A implementação não foi, no entanto, bem-sucedida devido a problemas na deteção das CTCs.

A qualidade das amostras é uma das maiores preocupações de quem utiliza biobancos. Com este trabalho foi possível confirmar a qualidade das amostras armazenadas pelo Biobanco na coleção de Tumores, nomeadamente DNA e soro para extração de exossomas. Do ponto de vista científico, com este projeto foi possível criar e disponibilizar à comunidade científica um importante recurso, o banco de exossomas.

### **Palavras-chave:**

Biobanco, Biópsias Líquidas, CTC, Exossomas, DNA



## Abstract

Biobanco-iMM is a non-profit structure integrated into the Lisbon Academic Medical Center (CAML). Created in 2008 at the Instituto de Medicina Molecular (iMM-JLA), its main objective is to promote biomedical research.<sup>1</sup>

Oncology is currently a research area in great development, namely in the search for new therapeutic and diagnostic methods. Thus, the development of this project had as objectives evaluate the quality of the existing liquid biopsies in the Tumors' collection and make available new biological resources, in order to meet the new demands of the scientific community.

For this purpose, the genomic stability of the stored DNA was evaluated by testing purity, integrity, and functionality, exosomes were isolated from stored serum samples and its quality was tested, and the possibility of implementing a circulating tumor cells (CTCs) enrichment service was tested.

From the evaluation of DNA stability, only purity revealed significant changes over the storage time, however, both the DNA and whole blood samples remained within the quality standards. Isolation of exosomes from stored serum was shown to be simple, however with some contamination. The arrays tested demonstrated the possibility of identifying specific markers even after storage. For the implementation of the CTC enrichment method two *Stem Cell* kits were tested and the *Rosettes* proved to be the method with the purest results. The implementation was, however, not successful due to problems in the detection of CTCs.

Sample quality is one of the biggest concerns of those who use biobanks. Here, it was possible to confirm the quality of the samples stored by Biobank in the collection of Tumors, namely DNA and serum for extraction of exosomes. From a strictly scientific point of view, with this project, it was possible to create and make available to the scientific community an important resource, the exosome bank.

### **Keywords:**

Biobank, Liquid Biopsies, CTC, Exosomes, DNA



## Índice

Índice de Figuras .....	3
Índice de Tabelas .....	5
Lista de Abreviaturas .....	7
1. Introdução.....	9
1.1 Banco de Tumores.....	9
1.1.1 Coleção de Tumores do Biobanco-iMM, CAML.....	10
1.1.2 Requisitos das Amostras e da Respetiva Informação Clínica .....	11
1.2 Biópsias Líquidas .....	13
1.2.1 DNA Genómico.....	14
1.2.2 Exossomas.....	15
1.2.3 Células Tumerais Circulantes .....	16
1.3 Objetivos .....	19
2. Métodos.....	19
2.1 Desenho do Estudo .....	19
2.2 População e Amostra .....	20
2.3 Metodologia .....	21
2.3.1 Avaliação da Estabilidade Genómica do DNA.....	21
2.3.2 Criação de um Banco de Exossomas.....	24
2.3.3 Enriquecimento e Enumeração de CTCs.....	25
2.4 Análise Estatística.....	27
3. Resultados.....	28
3.1 Avaliação da Estabilidade Genómica do DNA .....	28
3.1.1 Avaliação da Qualidade do DNA Extraído das Amostras de Sangue Total Armazenadas no Biobanco-iMM .....	28

3.1.2 Comparação dos resultados de CQ das Amostras da Coleção BIOPROST com o Grupo da Coleção de Tumores .....	29
3.1.3 Avaliação da Estabilidade do DNA Armazenado no Biobanco .....	30
3.1.4 Avaliação da Estabilidade do DNA em Relação ao Tempo de Armazenamento .....	31
3.1.5 PCR Quantitativo em Tempo Real .....	32
3.2 Criação de um banco de exossomas .....	35
3.3 Enriquecimento e Enumeração de CTCs .....	37
3.3.1 Comparação dos <i>kits</i> de enriquecimento .....	37
3.3.2 Otimização do painel de marcações para citometria de fluxo .....	38
3.3.3 Enriquecimento e análise de amostras de doentes .....	38
4. Discussão.....	39
4.1 Avaliação da estabilidade do gDNA .....	39
4.1.1 Comparação das amostras entre coleções .....	41
4.2 Criação de um banco de exossomas .....	41
4.3 Enriquecimento e Enumeração de CTCs .....	42
5. Conclusão.....	43
Bibliografia .....	45
ANEXOS .....	i
Anexo I – Bula PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix .....	iii
Anexo II – Descrição do conteúdo dos <i>arrays</i> Exo-Check.....	v
Anexo III – Comparação das concentrações das amostras de Rim, Bexiga e Próstata .	vii
Anexo IV – Resumo do Poster “Biobanco-iMM quality assurance-Factors Involved” ...	ix

## Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema do processamento das amostras da coleção de Tumores do Biobanco-iMM	10
Figura 2 - Distribuição das amostras da coleção de Tumores do Biobanco-iMM, CAML_11	11
Figura 3 - Biopsias Líquidas como uma fonte de informação molecular proveniente do tumor nos vários estadios do cancro.	13
Figura 4 - Distribuição dos valores da concentração (à esquerda) e dos rácios 260/280 (à direita) das amostras de DNA extraídas a fresco (T0) e após armazenamento (T1) do ST.	28
Figura 5 - Resultados de uma das electroforeses do gDNA em gel de agarose 1%.	29
Figura 6 – Valores individuais do rácio 260/280 (em cima) e de concentração (em baixo) obtidos para cada amostra de DNA extraído a fresco (T0) e após armazenamento do ST (T1).	29
Figura 7 - Comparação da distribuição das concentrações entre coleções. Para esta comparação foram usados os valores das concentrações do DNA extraído a fresco (T0)(N=104).	30
Figura 8 – Distribuição das concentrações (à esquerda) e dos rácios 260/280 (à direita) do DNA extraído do ST a fresco (T0) antes e depois do armazenamento.	31
Figura 9 - Comparação das concentrações (à esquerda) e dos rácios 260/280 (à direita) do DNA extraído a fresco (T0) e do DNA extraído de ST armazenamento (T1) ao longo do tempo de armazenamento a -80°C.	31
Figura 10 - Curvas de Melting dos pares de primers testados.	32
Figura 11 – Reta de calibração obtida.	33
Figura 12 - Curvas de amplificação das amostras T0 (em cima) e T1 (em baixo) seleccionadas.	34
Figura 13 – Comparação da quantidade de DNA amplificado por qPCR entre os grupos T0 e T1 (à esquerda) e ao longo do tempo de armazenamento a -80°C .	35
Figura 14- Reta de calibração obtida para quantificação das proteínas totais nas amostras de exossomas.	35
Figura 15 - Gráficos biparamétricos com os resultados de citometria de fluxo.	37
Figura 16 – Resultados da marcação das células MCF7.	38

Figura 17 – Resultados da análise por citometria da marcação das células MDA-MB-231.

---

38

Figura 18 - Resultados da análise por citometria da marcação das amostras de 3 doentes oncológicos.

---

39



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização das amostras utilizadas. _____	20
Tabela 2 - Distribuição das amostras selecionadas por data de entrada/tempo de armazenamento no Biobanco _____	21
Tabela 3 - Características dos primers testados. _____	23
Tabela 4 – Set Up da Reação de qPCR _____	24
Tabela 5 – Descrição dos dois métodos de enriquecimento negativo comparados neste estudo. _____	26
Tabela 6 - Painel de marcação para identificação das CTCs por citometria _____	27
Tabela 7 - Expressão dos marcadores de superfície nas células escolhidas para controlo positivo. _____	27
Tabela 8 – Resultados obtidos no CQ dos exossomas testados. _____	36



## Lista de Abreviaturas

CAML - Centro Académico de Medicina de Lisboa

CN – Controlo Negativo

CP – Controlo Positivo

CQ – Controlo de Qualidade

CTC – Células Tumorais Circulantes (do inglês *Circulating Tumor Cells*)

ctDNA – DNA tumoral circulante (do inglês *Circulating Tumor DNA*)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

EMT – Transição Epitélio-Mesênquima (do inglês *Epithelial–mesenchymal Transition*)

EpCAM – Molécula de Adesão Celular Epitelial (do inglês *epithelial cellular adhesion molecule*)

EVs – Vesículas extracelulares (do inglês *Extracellular Vesicles*)

iMM-JLA – Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes

IQR – Intervalo Interquartis (do inglês *Interquartile Range*)

LIMS - *Laboratory Information Management System*

miRNA – micro RNA

mRNA – RNA mensageiro

PBMC - Células Mononucleares do Sangue Periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS - Tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PI – Investigador Principal (do inglês *Principal Investigator*)

qPCR – Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real (do inglês *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

SOP – Procedimentos Operativos Normalizados (do inglês *Standard Operating Procedures*)

ST – Sangue Total

TA – Temperatura Ambiente

T<sub>m</sub> – Temperatura de Melting

UVS – Espectrofotometria Ultravioleta (do inglês *Ultraviolet Spectrophotometry*)



# 1. Introdução

## 1.1 Banco de Tumores

Um Banco de tumores é um repositório de amostras de doentes oncológicos, e eventualmente de controlos normais, onde podem ser armazenados não só fragmentos de tecido tumoral e normal (adjacente ao tumor) como também células e fluídos biológicos e/ou seus derivados como, por exemplo, ácido desoxirribonucleico (DNA), Ácido Ribonucleico (RNA) ou proteínas. O objetivo destes bancos é armazenar material biológico em condições ideais e controladas para a sua utilização em investigação biomédica. Estes bancos permitem também o armazenamento temporário de amostras para o diagnóstico, para a avaliação de fatores de prognóstico ou para a identificação de alvos terapêuticos.<sup>2-4</sup>

Um Banco de Tumores, assim como outro biobanco, é uma ferramenta estratégica para o desenvolvimento da medicina de precisão e da investigação translacional. Ao reunir amostras biológicas, permite aos investigadores a obtenção de um número importante de amostras num reduzido período de tempo e a possibilidade de realizarem análises retrospectivas em amostras com informação clínica detalhada.<sup>3,5</sup>

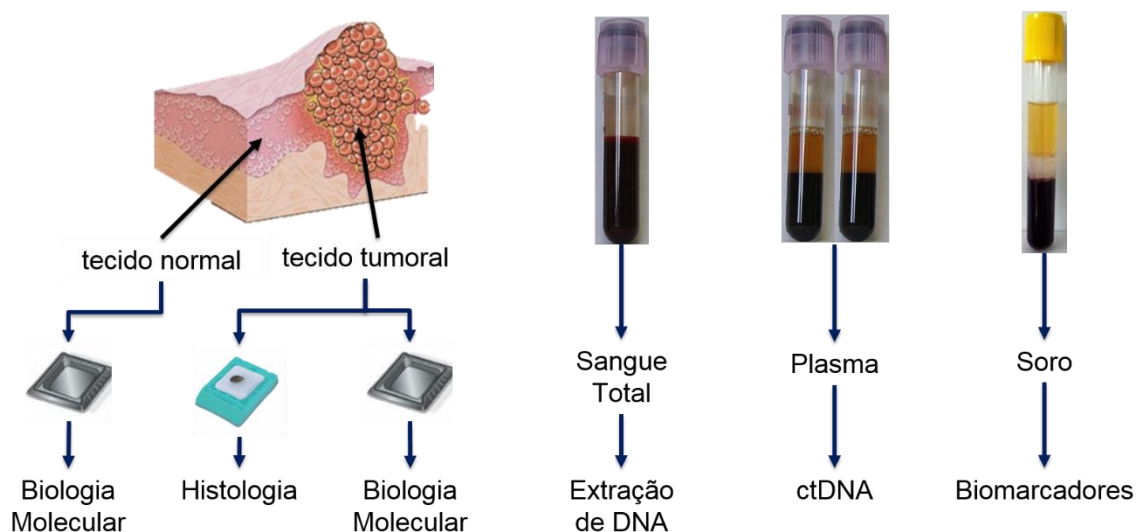
Diversos requisitos devem ser cumpridos de forma a garantir um banco de amostras de qualidade: a seleção da amostra deve ser criteriosa, a capacidade de armazenamento de cada banco deve ser definida e a escolha do tipo de patologia deve respeitar alguns critérios. Idealmente deverão ser armazenadas amostras de patologias com interesse para os utilizadores do biobanco e para a investigação, desde tumores raros até tumores com incidência mais frequente.<sup>2</sup> A qualidade das amostras e da respetiva história clínica é também de extrema importância.<sup>6</sup> É por isto que a participação ativa de um médico patologista é um requisito obrigatório para a criação destes bancos, uma vez que

desempenha um papel crucial na identificação e classificação morfológica de todas as amostras de tecido.<sup>2</sup>

### 1.1.1 Coleção de Tumores do Biobanco-iMM, CAML

O Biobanco-iMM, CAML é uma estrutura sem fins lucrativos integrada no Centro Académico de Medicina de Lisboa (CAML), criada em 2008 pelo Instituto de Medicina Molecular (iMM) com o objetivo de promover e incentivar a investigação biomédica.<sup>1</sup>

A coleção de Tumores do Biobanco-iMM é atualmente composta por amostras de sangue total (ST), soro, DNA genómico, plasma para isolamento de DNA tumoral circulante (ctDNA) e tecido, processadas como explica a Figura 1. Todas as amostras são voluntariamente doadas por pacientes com história clínica relevante e provêm de diversas instituições/hospitais do país. Os dadores são devidamente informados e consentem a preservação e uso futuro das suas amostras em projetos de investigação biomédica.<sup>1,7,8</sup> Respeitando os requisitos da Rede Nacional de Bancos de Tumores, antes de chegarem ao Biobanco-iMM todas as amostras de tecido passam pela Anatomia Patológica do hospital, onde o Patologista desempenha um papel crucial na identificação e classificação morfológica.<sup>2</sup>



*Figura 1 - Esquema do processamento das amostras da coleção de Tumores do Biobanco-iMM (fonte: sistematização própria). Tal como exigido, todas as amostras de tecido são colhidas e processadas na Anatomia Patológica do Hospital.<sup>2</sup>*

No início deste projeto, a coleção de Tumores era composta por um total de 5529 amostras provenientes de 952 dadores diferentes. Estas amostras estavam distribuídas

por diversos tipos de tumores (Figura 2), sendo a sua maioria de tumores colorrectais, seguido por tumores urológicos, gástricos e da mama.

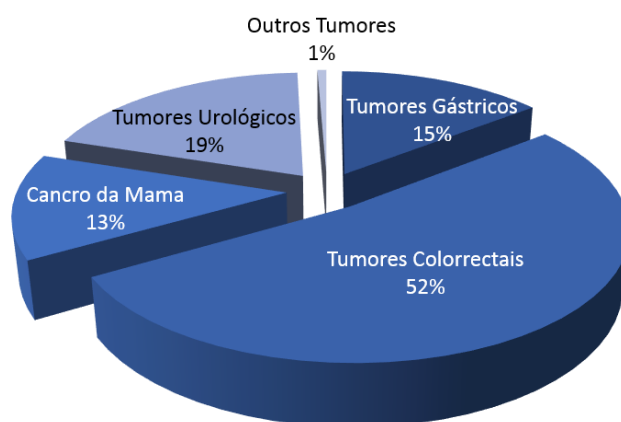


Figura 2 - Distribuição das amostras da coleção de Tumores do Biobanco-iMM, CAML (Fonte: Polido-Pereira, J) <sup>9</sup>

No entanto, na maioria dos tumores, o Biobanco-iMM apenas recebe e armazena amostras de tecido. A porção mais ativa no envio de amostras são os tumores urológicos, sendo a única com amostras de sangue.

### 1.1.2 Requisitos das Amostras e da Respetiva Informação Clínica

Após a receção das amostras no biobanco, o material biológico é processado e armazenado de acordo com os Procedimentos Operativos Normalizados (SOP) do Biobanco-iMM. A respetiva informação clínica é inserida no *Laboratory Information Management System* (LIMS), uma base de dados informática de acesso restrito que para além de ser uma ferramenta de gestão da informação permite a rastreabilidade de todas as amostras.<sup>1,7,10</sup> Informações básicas, como género e idade, e informações mais específicas da patologia tais como a localização do tumor, o diagnóstico histopatológico, se houve metastização e onde e o tipo de tratamento recebido, são algumas das informações armazenadas nesta base de dados. Outro tipo de informação pode ser recolhida posteriormente, mediante pedido do investigador, através do contacto com o Hospital.

Respeitando a atual política de proteção de dados, toda a informação contida no LIMS é codificada, sem qualquer identificação dos dadores. O armazenamento destas informações e das respetivas amostras está devidamente autorizado pela Comissão Nacional de Proteção de Dados e pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Lisboa

Norte – Hospital Santa Maria, respeitando a lei da Informação Genética Pessoal e Informação de Saúde (Lei nº12/2005 de 26 de janeiro).<sup>7,10</sup>

Todo o equipamento de armazenamento a frio está equipado com sondas de controlo de temperatura que permitem a deteção e rápida resolução de qualquer falha que possa comprometer a qualidade das amostras. Para garantir as melhores condições de trabalho destes equipamentos, a temperatura da sala onde se encontram é também mantida estável e controlada.<sup>10</sup> Em caso de falha, o iMM-JLA tem disponível *backup* de frio para onde, em eventuais emergências (p.ex. avaria de uma arca de armazenamento ou do ar condicionado da sala), podem ser transferidas as amostras em risco.

As amostras de sangue são processadas o mais rápido possível, preferencialmente no mesmo dia (até 6 horas depois da colheita). No tempo entre a colheita e o processamento todas as amostras são mantidas a 4°C. Qualquer alteração nestes requisitos, assim como qualquer não conformidade visível durante o processamento, como por exemplo hemólise e icterícia, é registada na base de dados.<sup>11</sup>

De cada amostra de ST recebida é reservada uma alíquota de 200µL para extração a fresco de DNA. A extração é feita por método automático utilizando *kits* específicos de acordo com as especificações do fabricante. Para garantir a qualidade destas amostras em todas as aplicações *downstream*, todas as amostras de DNA obtidas são submetidas à quantificação e à avaliação da pureza através do método de espectrofotometria por ultravioleta (UVS). Se estes parâmetros estiverem dentro dos valores aceitáveis, avalia-se ainda a qualidade do DNA através da realização de um gel de agarose a 1% de forma a avaliar a integridade das cadeias. Qualquer amostra que não cumpra os requisitos mínimos\* é automaticamente rejeitada.<sup>12</sup>

As amostras armazenadas no Biobanco-iMM estão disponíveis para todos os investigadores e para todos os projetos de investigação de interesse público, em qualquer centro de investigação ou indústria, em Portugal ou no Estrangeiro. A sua entrega ocorre apenas após a aprovação pelas Comissões Científica e Ética.<sup>1,7</sup> O acesso a amostras raras e potencialmente limitadas é cuidadosamente coordenado e controlado.<sup>8</sup>

---

\* Concentração >10ng/µL e rácio A260/A280 entre 1.7-2.05



## 1.2 Biópsias Líquidas

Biópsia líquida é o nome dado às amostras de fluídos biológicos recolhidas para posterior pesquisa de biomarcadores<sup>†</sup> provenientes de tumores.<sup>13</sup> Estes biomarcadores podem ser células ou moléculas libertadas pelo tumor no sangue ou em outros líquidos biológicos (Figura 3).<sup>13,14</sup>

As biópsias líquidas podem ser usadas no diagnóstico de cancro em estadios iniciais, no planeamento e monitorização do tratamento e na deteção de recidivas.<sup>13</sup>

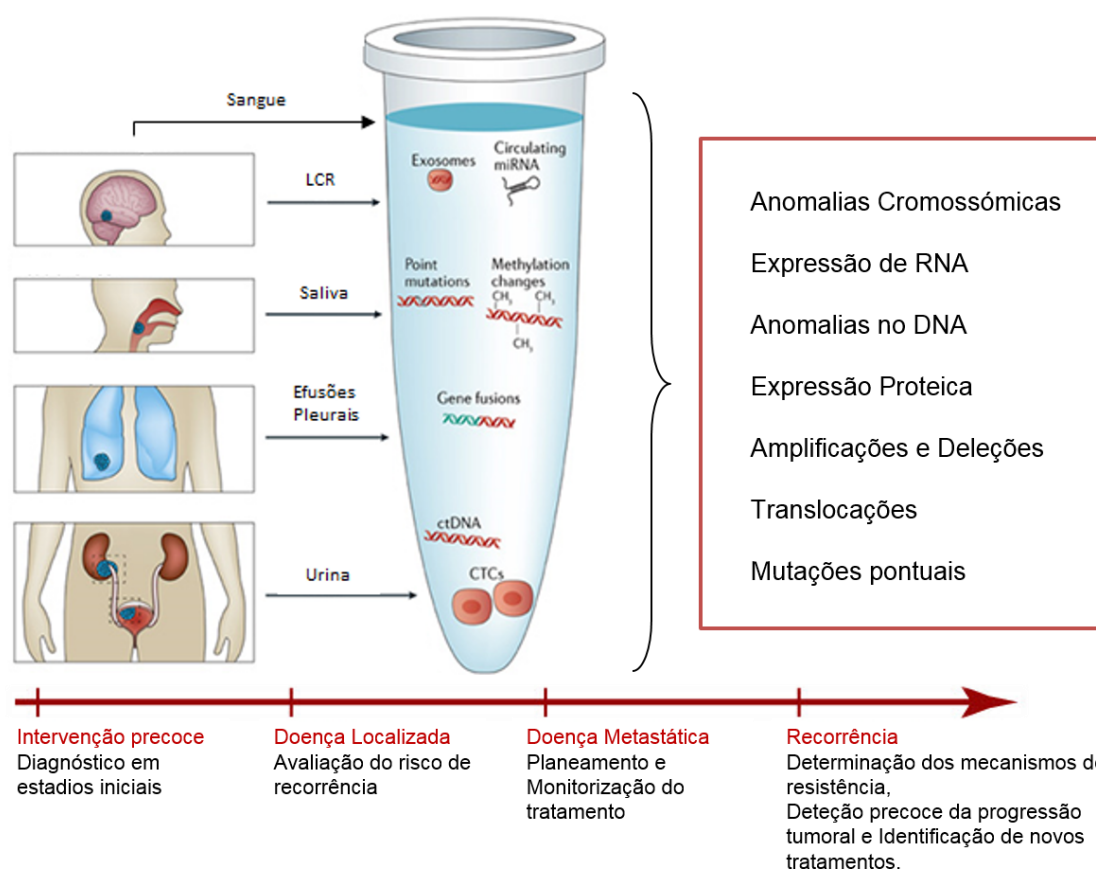


Figura 3 - Biópsias Líquidas como uma fonte de informação molecular proveniente do tumor nos vários estadios do cancro. (fonte: adaptado de Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Siravegna G. et al. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017 e de <https://www.healio.com/hematology-oncology/learn-genomics/introduction-to-liquid-biopsies/what-is-a-liquid-biopsy>. Acessado em 12.09.2019).<sup>15</sup> Células tumorais circulantes (CTC), exossomas tumorais e diversos tipos de moléculas, como o DNA tumoral circulante (ctDNA), podem ser isolados a partir de diferentes fluidos corporais.

Com o surgimento de evidências da presença de biomarcadores de tumores em fluídos biológicos, as biópsias líquidas têm vindo a despertar um crescente interesse. A sua

<sup>†</sup> De acordo com a definição da *Food and Drug Administration*, um biomarcador é uma “uma característica que é medida como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas a uma exposição ou intervenção, incluindo intervenções terapêuticas”. Podem ser moleculares (glicose), histológicos, radiográficos (tamanho do tumor) e fisiológicos (pressão sanguínea).<sup>53</sup>

natureza não invasiva permite reduzir significativamente a agressividade e morbidade associada às biópsias convencionais e colmatar a pouca especificidade a elas associados.<sup>14</sup> Desta forma, as biópsias líquidas podem ser realizadas mais frequentemente, oferecendo assim uma monitorização mais rigorosa e personalizada da doença.<sup>13,14</sup> Isto tem particular importância durante o tratamento, permitindo um acompanhamento temporal da carga tumoral e a deteção precoce de resistência à terapêutica ou de recidiva.<sup>14</sup>

Enquanto as biópsias de tecido, sendo obtidas de uma única região tumoral, não são representativas da heterogeneidade do tumor, podendo mesmo não ser possível a sua deteção, com apenas um teste, as biópsias líquidas poderão refletir o perfil genético do tumor e dos seus possíveis subclones presentes num paciente.<sup>14</sup>

Todas estas vantagens representam uma inovação significativa no campo da medicina de precisão.<sup>14</sup> Tendo isto em consideração, este projeto foca-se em alguns biomarcadores presentes na corrente sanguínea, tais como as CTCs, os exossomas e, embora não normalmente incluído no estudo das biópsias líquidas, o DNA genómico.

### 1.2.1 DNA Genómico

A extração de DNA evoluiu substancialmente desde que foi realizada pela primeira vez em 1869, permitindo hoje uma ampla gama de aplicações *downstream* úteis no campo da biologia molecular.<sup>16</sup> O DNA genómico, extraído de diferentes tipos de amostras biológicas, é hoje largamente utilizado, especialmente na deteção de mutações, no perfil de DNA, no diagnóstico de doenças e na genotipagem.<sup>17</sup>

O estudo do perfil do DNA tem desempenhado um papel crucial na compreensão da biologia dos cancros, nomeadamente na identificação de oncogenes e de genes supressores tumorais e na descoberta de vias de sinalização que leva ao crescimento dos cancros. A identificação de ferramentas moleculares preditivas e prognósticas permite melhores decisões terapêuticas, sendo um passo importante para a terapia individualizada e melhorando os resultados dos pacientes.<sup>18</sup>

Estudos têm mostrado que existem algumas mutações germinativas, numa pequena percentagem de pessoas, que aumentam a sua suscetibilidade ao desenvolvimento de certos tipos de cancro durante a vida. Esses estudos concentraram-se essencialmente nos

cancros da mama, próstata, ovário e coloretal. Algumas falhas genéticas podem mesmo aumentar o risco de mais de um tipo de cancro. <sup>19</sup> A existência de um banco de DNA genómico de pacientes com tumores urológicos permite não só a análise retrospectiva destas amostras como também facilita o desenvolvimento da investigação nestas áreas, possibilitando maior desenvolvimento destes temas e a descoberta de novas aplicações.

### 1.2.2 Exossomas

Os exossomas são vesículas extracelulares ativamente libertadas pelas células para o microambiente extracelular. Medem entre 30 a 150nm e contêm proteínas e lípidos citossólicos e membranares, DNA (incluindo DNA mitocondrial e DNA de cadeia simples e dupla), RNA mensageiro (mRNA), micro RNA (MiRNA) e outros RNAs não codificantes das células que lhe deram origem, refletindo a respetiva função.<sup>20-22</sup>

Várias evidências mostraram que os exossomas interagem com as células-alvo libertando o seu conteúdo no espaço intracelular, desempenhando desta forma um papel importante na interação célula-célula.<sup>20,21</sup> Apesar de serem secretados pela maioria dos tipos celulares do corpo humano acredita-se que estas vesículas são libertadas em maior número pelas células tumorais.<sup>14,20</sup>

Ao modularem vários mecanismos biológicos, os exossomas provenientes de células tumorais participam no desenvolvimento e progressão tumoral. Estas vesículas tumorais apresentam funções pleiotrópicas, tanto no ambiente local, como em ambientes distantes, participando na promoção da angiogénese, na sobrevivência e proliferação celular, na vigilância imunológica, na apresentação de antígenos e na preparação do nicho metastático, contrastando com os exossomas derivados de células “normais” que têm a capacidade de inibir as células tumorais e de controlar o fenótipo dormente das células cancerosas em latência metastática.<sup>21,22</sup>

Uma vez que as “impressões digitais” dos exossomas refletem as suas células parentais, a sua quantificação e composição bioquímica e molecular (proteínas, lípidos e ácidos nucleicos) têm sido amplamente reconhecidas como biomarcadores promissores para o diagnóstico, prognóstico e monitorização de doenças tumorais, bem como de outras condições médicas.<sup>21,22</sup> A possibilidade do seu isolamento a partir de fluídos corporais, como o sangue, urina, leite materno e sêmen, é outro aspeto que os torna um atraente

biomarcador não invasivo para o diagnóstico clínico.<sup>20-22</sup> Outra vantagem destas vesículas é o facto de serem delimitadas por uma membrana de bicamada lipídica que protege a sua carga de RNases e proteases.<sup>20</sup>

O conhecimento crescente do papel funcional do exossomas, principalmente na progressão tumoral, permitiu o desenvolvimento de drogas dirigidas às propriedades dos exossomas e à sua produção e absorção. Este conhecimento trouxe também a possibilidade de explorar o uso destas vesículas como vacinas contra o cancro e como veículos de cargas terapêuticas, uma aplicação terapêutica adicional atualmente muito promissor que explora a sua capacidade de reconhecer alvos específicos, a sua inércia imunológica e a sua capacidade de induzir potentes respostas celulares.<sup>21,22</sup>

Apesar de todas as suas potencialidades, não existem ainda procedimentos padronizados e otimizados para o seu isolamento, caracterização e armazenamento. Não há informação específica relativamente ao efeito dos anticoagulantes na colheita e armazenamento dos exossomas nem um consenso em questões como a temperatura ótima e períodos aceitáveis de armazenamento. Os efeitos do tempo de armazenamento, dos ciclos de congelação e descongelação, das condições ideais para descongelação entre outras variáveis padecem também de mais estudos. É neste sentido que os biobancos se apresentam como importantes aliados, permitindo a realização de ensaios direcionados à comparação de protocolos de isolamento, deteção e armazenamento e o desenvolvimento de *guidelines*.<sup>23</sup>

### 1.2.3 Células Tumorais Circulantes

As CTCs são células tumorais que se libertam do tumor primário através de dissociação mecânica ou por transição epitélio-mesênquima (EMT) passando assim para a circulação sanguínea. Através de estudos com modelos animais e de casos clínicos sabe-se que estas células têm a capacidade de migrar para órgãos distantes e de estabelecer metástases.<sup>24,25</sup>

Descritas pela primeira vez em 1869, as CTCs apenas foram adicionadas aos testes clínicos em 2004 para os cancros metastáticos da mama, próstata e coloretal, tornando-se um indicador prognóstico independente de sobrevida para essas doenças.<sup>24</sup> Esta lacuna temporal deveu-se à grande dificuldade de utilização destas células resultante dos

desafios observados no seu isolamento e detecção, nomeadamente devido aos seus baixos números, à sua morfologia heterogénea (nomeadamente em relação ao tamanho e a outras alterações relacionadas com o processo EMT) e à ausência de marcadores específicos, exclusivos, bem definidos e universais para todos os tipos de células malignas.<sup>24,26</sup>

Ultrapassando-se todos os desafios, as CTCs e a sua detecção podem ser vistas como uma forma menos invasiva de obtenção de células tumorais que podem ser usadas não só para caracterizar fenotipicamente o tumor, mas também como uma fonte de DNA e RNA para pesquisa de mutações ou alterações na expressão de genes chave.<sup>24</sup> Assim como os exossomas, as CTCs libertadas do tumor primário ou das metástases, têm assinaturas específicas que traduzem a sua origem. Estas assinaturas fornecem não só um vislumbre do perfil molecular das características gerais do tumor de um paciente, como também permitem prever o seu destino de disseminação. Esta informação torna possível a escolha de um tratamento direcionado e personalizado a cada doente em cada momento.<sup>26</sup>

O facto de as CTCs poderem ser encontradas no sangue muito antes de um tumor ou metástase ser diagnosticado faz delas também um potencial parâmetro de diagnóstico precoce da doença, permitindo a visualização de doença residual mínima e de subclones de células tumorais não detetados por biópsia de tecido.<sup>24,26</sup>

Alterações nas contagens das CTCs ao longo da terapia sistémica permitem a monitorização da resposta ao tratamento e facilitam também a detecção precoce de possíveis recorrências ou disseminações metastáticas. A enumeração das CTCs está também relacionada com a agressividade do cancro e com o prognóstico da doença.<sup>14,24,26</sup>

Apesar de todo o seu potencial, este recurso possui ainda muitas áreas que requerem desenvolvimento, não apenas para ultrapassar os desafios do seu isolamento e detecção, como também para compreender o potencial metastático destas células e alcançar o seu melhor uso para benefício do paciente.<sup>24,26</sup> Além disso, com exceção do cancro da próstata, as patologias geniturinárias estão ainda muito pouco exploradas.<sup>25</sup> É neste sentido que o Biobanco-iMM quis estudar este recurso e definir em que sentido poderia ser útil à sua investigação.

As técnicas de isolamento e a posterior análise das CTCs são procedimentos demorados e dispendiosos e a sua análise deve ser realizada num limitado espaço de tempo após a colheita dificultando o seu estudo, quer na rotina, quer em ensaios clínicos. Uma vez que nem sempre é claro à partida quais as amostras que justificarão todo este trabalho e de forma a permitir uma maior flexibilidade ao investigador ou mesmo a possibilidade de análises retrospectivas, surge a importância do armazenamento de CTCs.<sup>27,28</sup>

Diversos estudos demonstraram a possibilidade de isolar CTCs a partir de amostras de PBMCs criopreservados mantendo as suas características morfológicas, genéticas e imunohistoquímicas.<sup>28-31</sup> Este facto é, por si só, uma grande conquista, no entanto, o problema do tempo de processamento mantém-se, uma vez que as amostras terão de ser isoladas e imediatamente analisadas.

O armazenamento de CTCs enriquecidas carece ainda de desenvolvimento, porém Mesquita *et al* demonstrou já a possibilidade de armazenar amostras enriquecidas pelo método *CellSearch* em glicerol<sup>‡</sup> a -20°C., mantendo a sua integridade genómica e a capacidade de recuperar células individuais.<sup>27</sup>

De entre os inúmeros métodos de enriquecimento de CTCs, o *CellSearch* é o mais bem estabelecido sendo o único aprovado pela *Food and Drug Administration*. Contudo este método baseia-se no enriquecimento positivo através anticorpos direcionados à molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), característica que o torna inadequado para o enriquecimento de amostras que carecem deste marcador, como é o caso dos cancros renais.<sup>27,28,32</sup> Para ultrapassar este problema, inúmeras alternativas foram desenvolvidas, nomeadamente métodos de enriquecimento negativo, métodos que se baseiam na depleção das células sem interesse, como os leucócitos. Apesar de não atingirem os mesmos níveis de pureza, estes métodos permitem a obtenção de amostras sem o viés proporcionado pela seleção de marcadores específicos nem contaminadas com anticorpos acoplados aos marcadores de superfície das células.<sup>33,34</sup>

---

<sup>‡</sup> Como uma alternativa ao DMSO, um crioprotetor habitualmente utilizado para criopreservação, mas que pode afetar negativamente as células pela exposição a compostos bipolares fortes.<sup>27</sup>

### 1.3 Objetivos

O principal objetivo deste projeto foi a avaliação da qualidade das amostras de tumores urológicos, da coleção de Tumores do Biobanco-iMM, determinando a possibilidade da sua utilização como biópsias líquidas. Acreditamos que este estudo, ao avaliar a qualidade das amostras, contribui para solidificar a importância da coleção de tumores e permite a promoção da investigação na medicina translacional e de precisão.

Os objetivos secundários deste projeto foram:

- Avaliar a estabilidade do DNA genómico das amostras armazenadas
- Criar um banco de Exossomas dentro da coleção de Tumores
- Implementar um método de enriquecimento e quantificação CTCs como serviço no Biobanco-iMM

## 2. Métodos

### 2.1 Desenho do Estudo

Este estudo consistiu em três partes interligadas pelo interesse nas biópsias líquidas.

Na primeira parte, avaliamos a qualidade e a estabilidade do DNA genómico armazenado no Biobanco-iMM através da determinação do rendimento, da pureza e da integridade das amostras e da comparação destes valores nas amostras antes e depois do armazenamento a -80°C.

A segunda parte teve como principal interesse a criação de um banco de exossomas, onde foi necessário encontrar um método de isolamento eficiente e uma forma de controlar a presença e a qualidade dos exossomas isolados.

Por fim, o último objetivo foi encontrar um método de enriquecimento de CTCs que pudesse ser também implementado no Biobanco-iMM de forma a estar disponível mais um serviço facilitador para os investigadores. A par disto foi necessário otimizar todo o processo de análise por citometria de fluxo de forma a confirmar a presença e a qualidade das amostras enriquecidas.

A última parte foi a única com necessidade de recurso a amostras frescas, tendo as anteriores sido feitas a partir de amostras já existentes e armazenadas no Biobanco-iMM a -80°C: amostras de DNA e ST na primeira parte e amostras de soro na segunda.

## 2.2 População e Amostra

Como referido anteriormente, os tumores urológicos são o único subgrupo da coleção de tumores do Biobanco-iMM com envio ativo de amostras de sangue. Por serem também um tipo de tumores com um baixo foco de investigação e com o objetivo de enriquecer esta coleção de forma a ir de encontro às exigências da comunidade científica, decidi utilizar este subgrupo como a minha população de estudo. No início deste projeto, esta coleção tinha disponíveis amostras de 75 pacientes com cancro do rim e 25 com cancro da bexiga. Com o objetivo de enriquecer o estudo foram também incluídas amostras de 20 pacientes da coleção BIOPROST, uma coleção independente de patologias da próstata. A caracterização das amostras utilizadas e das amostras excluídas encontra-se na tabela 1.

*Tabela 1 - Caracterização das amostras utilizadas.*

	Número total de dadores	gDNA	Exossomas	CTCs
<i>Total</i>	131	120	120	Amostras frescas colhidas no bloco operatório do Hospital Santa Maria e que entraram no Biobanco após o início deste projeto.
<i>Excluídas</i>	11 só com tecido	6 sem ST para reextrair 5 sem extração à entrada	5 sem soro 5 com erros de identificação	
<i>Utilizadas</i>	120	109	110	
<i>Rim</i>	75	65	68	
<i>Bexiga</i>	25	24	22	
<i>Próstata</i>	20	20	20	

Toda a informação clínica necessária foi retirada do LIMS, a base de dados do Biobanco-iMM. Esta informação foi previamente obtida através de questionários clínicos e introduzida no LIMS, devidamente codificada e sem qualquer identificação dos dadores, pela equipa do Biobanco.



## 2.3 Metodologia

### 2.3.1 Avaliação da Estabilidade Genômica do DNA

Para a avaliação da estabilidade genômica do DNA após o armazenamento, extraiu-se o DNA das amostras de ST disponíveis e armazenadas a -80°C (T1). Após a extração, o rendimento, a pureza e a integridade foram avaliados de acordo com o SOP do Biobanco-iMM<sup>12</sup>. Os resultados obtidos foram depois comparados com os resultados do CQ do gDNA extraído a fresco aquando da entrada das mesmas amostras no Biobanco-iMM (T0).

Posteriormente as amostras foram divididas em três grupos de acordo com a data de entrada no biobanco (e consequentemente com o tempo de armazenamento) e, de cada grupo, foram selecionadas 10 (Tabela 2). As amostras de gDNA do T0<sup>§</sup> foram requantificadas segundo os SOP do Biobanco-iMM e todas as amostras selecionadas (30 T0 e as respetivas 30 T1) foram submetidas a um qPCR em tempo real (qPCR) de forma a confirmar a qualidade e a sua adequabilidade para testes *downstream* dos gDNA armazenados.

Tabela 2 - Distribuição das amostras selecionadas por data de entrada/tempo de armazenamento no Biobanco

<b>Ano de entrada (Tempo de armazenamento)</b>	<b>&lt;2015 (&gt; 3 anos)</b>		<b>2016 (2 anos)</b>		<b>2017 (&lt; 1 ano)</b>	
<b>Amostras</b>	Total	Selecionadas	Total	Selecionadas	Total	Selecionadas
<i>Bexiga</i>	12	4	8	3	4	3
<i>Rim</i>	33	6	22	7	10	7
<i>Total</i>	45	10	30	10	14	10

#### 2.3.1.1 Extração e CQ

O gDNA foi extraído por método automático no *QIACube* (Qiagen, Alemanha) utilizando o *kit QIAamp DNA Blood Mini Kit* da Qiagen. O controlo de qualidade foi realizado respeitando o SOP.BIO.004 EXTRAÇÃO DE DNA do Biobanco-iMM<sup>12</sup>:

- A quantificação e a avaliação da pureza foram obtidas por UVS no equipamento *Infinite® M200 PRO Multimode Microplate Reader* da Tecan:

<sup>§</sup> Considera-se T0 o tempo de extração do gDNA a fresco e T1 após armazenamento a -80°C.

- O rendimento do gDNA extraído foi determinado pelo cálculo da concentração do gDNA eluído em 100µL de *elution buffer* através do valor de absorvância a 260nm, onde  $A_{260}$  de 1.0 = 50µg/µL DNA.
- A pureza do gDNA foi determinada calculando o rácio das absorvâncias 260/280 nm.
- Após a avaliação do rendimento e da pureza das amostras de gDNA, a sua integridade foi avaliada através da realização de um gel de agarose a 1% (p/v) em Tris/Borato/EDTA (TBE) onde se utilizou o marcador de peso molecular NZYDNA ladder III da Nzytech. Para revelação das bandas foi utilizado o *GelGreen* (*GreenSafe Premium* da Nzytech) e os géis foram expostos à luz UV no *Chemidoc XRS+* da Bio-Rad.

Os resultados obtidos foram então comparados com os valores do CQ do gDNA obtidos a partir das amostras de ST no momento em que entraram no biobanco (informação retirada do LIMS).

#### 2.3.1.2 PCR Quantitativo em Tempo Real

O objetivo do qPCR foi avaliar mais aprofundadamente a integridade e a qualidade do gDNA extraído e armazenado no Biobanco-iMM. Para isso baseei-me na experiência do Banco Nacional de DNA de Salamanca, um dos maiores biobancos de DNA da Europa, com o qual o Biobanco-iMM já estabeleceu uma estreita colaboração e onde a qualidade é validada através da amplificação de 6 fragmentos de DNA de 6 cromossomas diferentes por PCR multiplex.<sup>35</sup> Baseando-me também num trabalho anteriormente realizado no Biobanco-iMM, selecionei, para este projeto, apenas um gene: gene do recetor IIB da activina (*ACVR2B*). Esta seleção recaiu no facto de o *ACVR2B* ser um gene presente em toda a população e, de entre os genes amplificados no protocolo espanhol, estar menos associado a patologias, diminuindo a possibilidade dos resultados do qPCR serem influenciados pelas condições dos doentes.<sup>1</sup>

O gene *ACVR2B* localiza-se no braço curto do cromossoma 3, mede cerca de 30Kb sendo composto por 11 exões. Este gene dá origem a uma proteína de mesmo nome, com 512 aminoácidos, um fator de crescimento e diferenciação que pertence à superfamília de sinalização do *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β).<sup>1,36</sup>

Para a amplificação do gene *ACVR2B* foram desenhados *primers* específicos para o gene-alvo usando o *software* *Primer-BLAST* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Nesta etapa foram tidas em consideração as seguintes características dos *primers*:

- Tamanho do *primer*: 18 - 24 nucleótidos,
- Não devem formar estruturas secundárias nem *primer-dimers*;
- Conteúdo G/C entre 40 a 60%;
- Temperatura de *Melting* ( $T_m$ ) entre 60 e 62°C e com uma diferença de  $\pm 1^\circ\text{C}$  entre *primers*;
- Ter um C ou G na extremidade 3' para potenciar a fase de *annealing* e de extensão;
- Evitar sequências de Cs e Gs superiores a 3 bases;
- Tamanho do *amplicon* entre 70-150 pb;
- O *amplicon* deve ser específico para a sequência alvo;

Após avaliação dos resultados obtidos foram escolhidos dois pares de *primers* a testar (Tabela 3).

*Tabela 3 - Características dos primers testados. Resultados obtidos através do Primer-BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI).*

<b>Primer FAB1</b>	<b>Sequência (5'→ 3')</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>GC%</b>
<b>F</b>	CTACAACGCCAACTGGGAGC	20	61,30	60
<b>R</b>	TCATCTAGCCAGCAGCCCTT	20	60,98	55

Tamanho do produto amplificado: 150

<b>Primer FAB2</b>	<b>Sequência (5'→ 3')</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>GC%</b>
<b>F</b>	GGCATGCTCAGTGGTTCTCT	20	60,04	55
<b>R</b>	CTCCCAGTTGGCGTTGTAGT	20	59,97	55

Tamanho do produto amplificado: 95

Para a realização do qPCR recorreu-se à *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* da *Applied Biosystems*. As amostras e os *standards* foram feitos em triplicado. As condições de *set up* do equipamento, assim como todas as recomendações do respetivo fabricante, foram respeitadas (Anexo I).<sup>37</sup> O qPCR foi realizado no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR system* e analisado no *7500 Software v.2.3* (*Applied Biosystems*, CA).

Após otimização, a amplificação realizou-se nas condições descritas na tabela 4. Todas as amostras testadas foram previamente diluídas para uma concentração de 10ng/μL.

Tabela 4 – Set Up da Reação de qPCR

Reagente	Concentração final	Volume (μL/poço)
PowerUp™ SYBR™ Green Master (2X)	1X	10.0
Forward primer	300nM	0.06
Reverse primer	300nM	0.06
Nuclease-Free Water		7.88
DNA	10 ng/μL	2.0
Volume total		20

### 2.3.2 Criação de um Banco de Exossomas

#### 2.3.2.1 Isolamento de Exossomas

Para a criação de um banco de exossomas foram utilizadas as 110 amostras de soro disponíveis no Biobanco-iMM, uma vez que era o recurso mais abundante (em comparação com o plasma) e que permitia não comprometer a disponibilidade de amostras na coleção para outras investigações. Estas amostras foram separadas respeitando os SOPs do Biobanco-iMM, através de centrifugação a 2000g, 10min à temperatura ambiente (TA), e armazenadas a -80°C. Para o isolamento dos exossomas recorreu-se ao *kit Total Exosome Isolation (from serum)* da Invitrogen, respeitando-se as recomendações do fabricante:<sup>38</sup>

- As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C e centrifugadas a 10.000g por 20min à TA para remover possíveis resíduos. 250μL do sobrenadante foi transferido para um tubo novo e os exossomas foram isolados de acordo com o protocolo do fabricante.
- Os exossomas foram ressuspensos em 75μL de Tampão fosfato-salino (PBS) 1x e armazenados a -80°C.

### 2.3.2.2 Controlo de qualidade dos exossomas isolados

De forma a confirmar a presença e qualidade dos exossomas extraídos testaram-se 4 amostras através da utilização de um *array* de anticorpos, o *Exo-Check antibody array* da *System Biosciences*. Este *array* possui 12 pontos pré-impressos, incluindo 8 anticorpos contra marcadores conhecidos de exossomas (CD63, CD81, ALIX, FLOT1, ICAM1, EpCAM, ANXA5 e TSG101), 2 controlos positivos, 1 controlo negativo (CN) e um marcador para monitorização da contaminação celular (GM130) (Anexo II).<sup>39</sup>

Para a realização dos *arrays* as amostras foram descongeladas à TA e analisadas pelo método de Bradford de forma a determinar a quantidade de proteínas na amostra. Para os *arrays* foi utilizado apenas 50µg de amostra e o protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

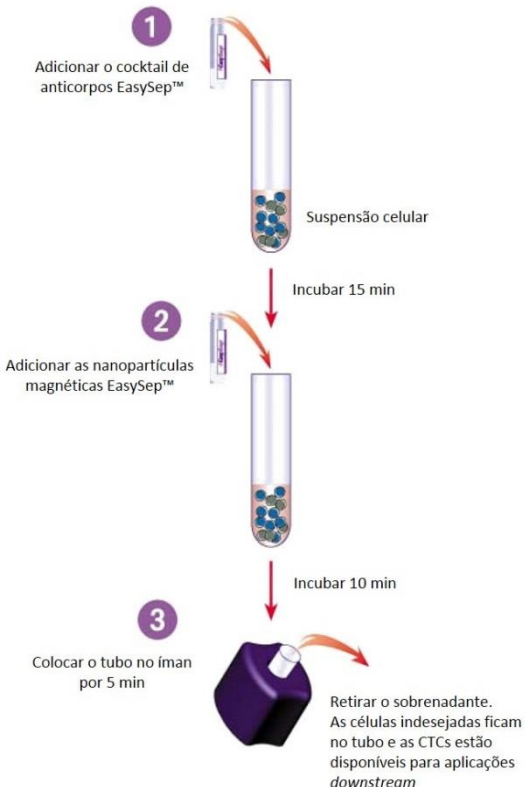
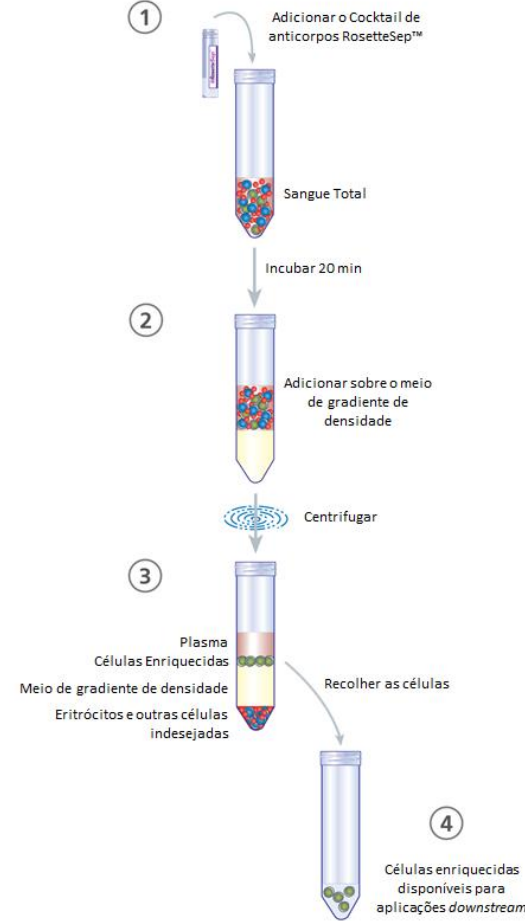
### 2.3.3 Enriquecimento e Enumeração de CTCs.

#### 2.3.3.1 Enriquecimento de CTCs

Com o intuito de implementar no Biobanco-iMM um serviço que facilitasse aos investigadores o acesso às CTCs foram testados dois *kits* de enriquecimento negativo de CTCs da *StemCell Technologies*, o *EasySep™ Direct Human CTC Enrichment Kit* e o *RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail* com Anti-CD56 (Tabela 5). Estes *kits* foram escolhidos por prometerem um enriquecimento simples, com melhores rendimentos e com a recuperação de uma amostra de CTCs pronta para qualquer análise *downstream*, como cultura celular, isolamento de ácidos nucleicos para análises genéticas ou caracterização por citometria de fluxo.<sup>40</sup>

A opção pelo enriquecimento negativo baseou-se na depleção dos componentes normais do sangue, enriquecendo todas as populações de CTCs, sem ser influenciado pela expressão dos marcadores de superfície habitualmente utilizados no enriquecimento positivo. Este método, apesar de apresentar uma pureza mais baixa, evita a perda de células com potencial em investigação como as CTCs em EMT e as CTCs pouco diferenciadas (perdidas pelos métodos tradicionais baseados na expressão do marcador de superfície EpCAM<sup>41</sup>), permitindo assim ao Biobanco oferecer um serviço útil a um maior número de potenciais interessados.<sup>26,33</sup>

Tabela 5 – Descrição dos dois métodos de enriquecimento negativo comparados neste estudo. Ambos os métodos utilizam anticorpos direcionados a células não desejadas (células hematopoiéticas e plaquetas).<sup>33,42,43</sup> Imagens retiradas e adaptadas de [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com).

EasySep™ Direct Human CTC Enrichment	RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail
 <p>1 Adicionar o cocktail de anticorpos EasySep™</p> <p>Suspensão celular</p> <p>Incubar 15 min</p> <p>2 Adicionar as nanopartículas magnéticas EasySep™</p> <p>Incubar 10 min</p> <p>3 Colocar o tubo no ímã por 5 min</p> <p>Retirar o sobrenadante. As células indesejadas ficam no tubo e as CTCs estão disponíveis para aplicações downstream</p>	 <p>1 Adicionar o Cocktail de anticorpos RosetteSep™</p> <p>Sangue Total</p> <p>Incubar 20 min</p> <p>2 Adicionar sobre o meio de gradiente de densidade</p> <p>Centrifugar</p> <p>3 Plasma Células Enriquecidas Meio de gradiente de densidade Eritrócitos e outras células indesejadas</p> <p>Recolher as células</p> <p>4 Células enriquecidas disponíveis para aplicações downstream</p>
<p>Utiliza anticorpos direcionados aos marcadores de superfície CD2, CD14, CD16, CD19, CD45, CD61, CD66b e Glicoforina A.</p> <p>Utiliza <i>beads</i> magnéticas ligadas aos anticorpos.</p> <p>Recorre a um ímã portátil para a separação das células ligadas às <i>beads</i>.<sup>42</sup></p>	<p>Utiliza anticorpos direcionados aos marcadores de superfície CD3, CD14, CD16, CD19, CD38, CD45, CD56, CD61, CD66b e Glicoforina A.</p> <p>A reação imunológica leva à formação de <i>immunorosettes</i> (complexos tetraméricos de anticorpos), aumentando a densidade das células indesejadas.</p> <p>Após centrifugação em meio de gradiente de densidade as <i>immunorosettes</i> e os eritrócitos livres são precipitados e separados das células de interesse.<sup>43</sup></p>

Para esta comparação foram utilizadas amostras de doentes oncológicos, colhidas no dia da realização do protocolo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

### 2.3.3.2 Controlo de qualidade das CTCs enriquecidas

Após o enriquecimento, para confirmar a presença de CTCs, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo no citómetro BD Accuri C6 da *BD Biosciences*. Para isso foi utilizado o seguinte painel:

Tabela 6 - Painel de marcação para identificação das CTCs por citometria

Anticorpo	Fluoróforo	Células a que se dirige
<b>Anti-EpCAM</b>	FITC	Células com características epiteliais
<b>Anti-Citoqueratina</b>	PE	Células com características epiteliais
<b>Anti-CD45</b>	PerCP	Marcador leucocitário
<b>Anti-Vimentina</b>	APC	Células com características mesenquimais

Para otimizar o protocolo de marcação e as compensações no citómetro foram utilizadas células MCF7 e MDA-MB-231. A marcação esperada destas células está descrita na Tabela 7.

Tabela 7 - Expressão dos marcadores de superfície nas células escolhidas para controlo positivo.<sup>44</sup>

Células	EpCAM	Citoqueratina	Vimentina
<b>MCF7</b>	+++	+++	-
<b>MDA-MB-231</b>	+/- ou -	+/- ou -	+++

Para avaliar possíveis interferências do *kit* de enriquecimento na marcação, as células selecionadas foram adicionadas a amostras de ST posteriormente enriquecidas e analisadas.

## 2.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0.1 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia USA. A distribuição de cada variável foi testada utilizando o teste D'Agostino & Pearson. O nível de significância *p* foi

definido para valores inferiores a 0,05. Os testes utilizados para comparação das variáveis estarão descritos em cada gráfico apresentado.

### 3. Resultados

#### 3.1 Avaliação da Estabilidade Genômica do DNA

Para avaliar a qualidade do DNA foram analisados o rendimento da extração, a pureza e a integridade e confirmamos a sua adequabilidade em testes *downstream* por qPCR. Foi também estudada a influência do tempo de armazenamento nestes parâmetros, quer nas amostras de DNA quer nas amostras de ST.

##### 3.1.1 Avaliação da Qualidade do DNA Extraído das Amostras de Sangue Total Armazenadas no Biobanco-iMM

Comparando os rendimentos das extrações a partir do ST antes e depois de ser armazenado obtiveram-se para as amostras frescas de DNA razões médias A260/A280 de 1,85 e concentrações médias de 67.52 ng/μL ( $n = 109$ ) e para as amostras de DNA extraídas das respetivas amostras de ST armazenadas ( $n = 109$ ) razões médias A260/A280 de 1,83 e concentrações médias de 78.40 ng/μL. A distribuição desses valores é apresentada nos gráficos seguintes.

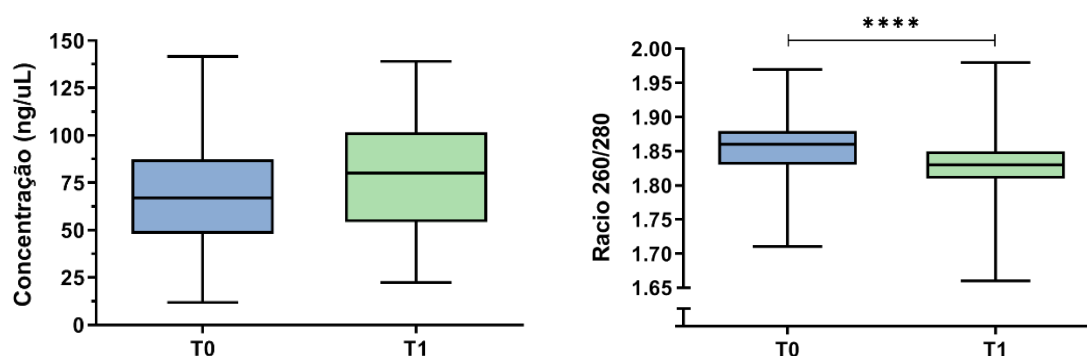


Figura 4 - Distribuição dos valores da concentração (à esquerda) e dos rácios 260/280 (à direita) das amostras de DNA extraídas a fresco (T0) e após armazenamento (T1) do ST. As amostras T0 e T1 foram comparadas através do teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas tendo sido obtidos valores de P de 0,0591 nas concentrações e 0,0001 nos rácios ( $n=87$ ).

Estes resultados mostram que o armazenamento do ST não influencia o rendimento da extração embora leve a uma ligeira diminuição da pureza do DNA.

Respeitando os procedimentos normais do Biobanco, as amostras que não cumpriam os



critérios de qualidade em relação aos rácios (4) e às concentrações (0) foram rejeitadas e apenas nas restantes amostras foi realizada a avaliação da integridade por gel de agarose a 1%.

A Figura 5 apresenta os resultados de 18 amostras representativas das 109 analisadas. Todas as amostras apresentaram uma banda de alto peso molecular, única e bem definida, demonstrando assim a integridade do DNA.

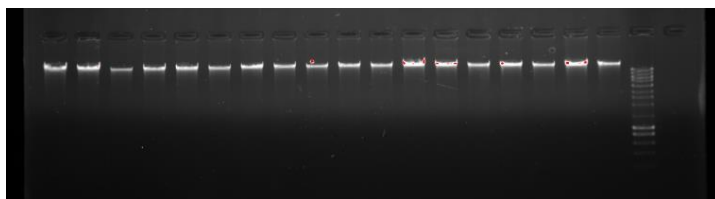


Figura 5 - Resultados de uma das eletroforeses do gDNA em gel de agarose 1%. Todas as amostras testadas apresentaram uma banda bem definida sem arrastamento.

### 3.1.2 Comparação dos resultados de CQ das Amostras da Coleção BIOPROST com o Grupo da Coleção de Tumores

Ao analisar os valores individuais de concentração e rácio A260/A280 de cada amostra (figura 6) foi possível verificar a existência de um grupo de pontos que apresentava uma concentração distinta das restantes. Estes pontos referiam-se às últimas amostras extraídas e analisadas, ou seja, às amostras da coleção BIOPROST.

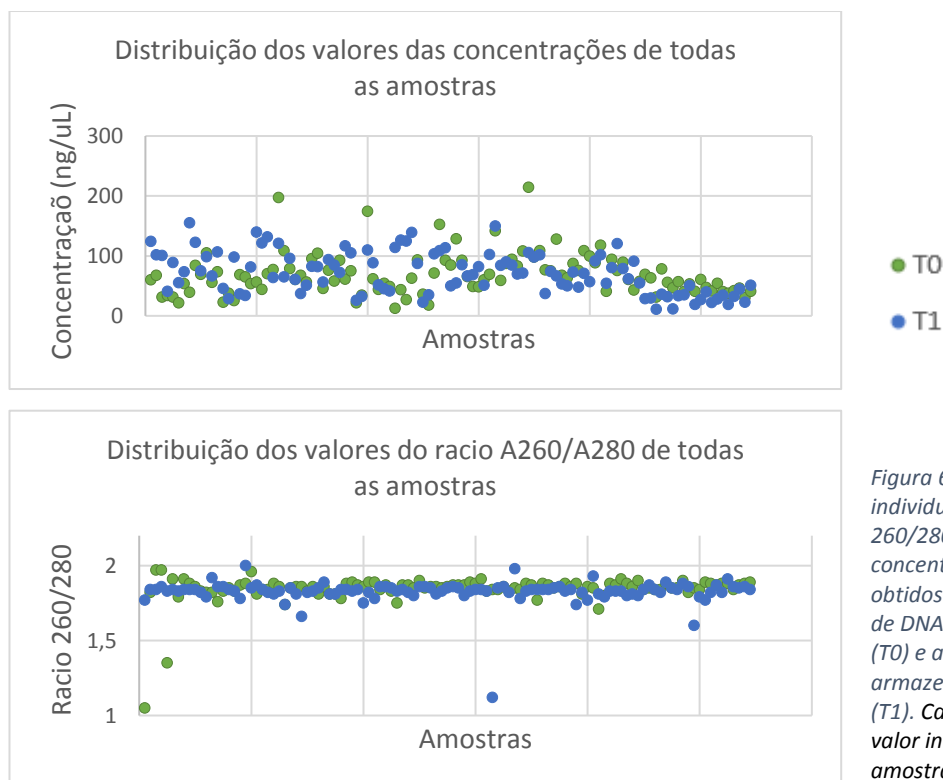
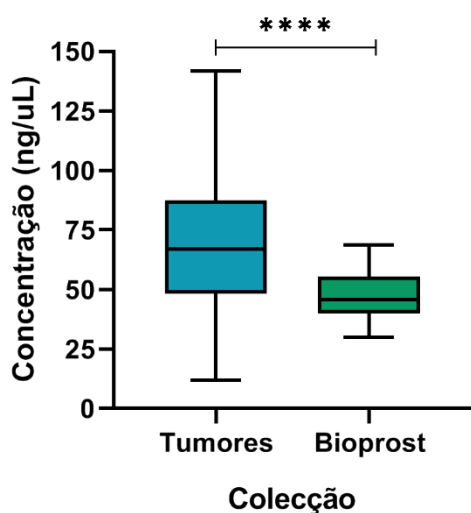


Figura 6 – Valores individuais do rácio 260/280 (em cima) e de concentração (em baixo) obtidos para cada amostra de DNA extraído a fresco (T0) e após armazenamento do ST (T1). Cada ponto indica um valor individual de uma amostra.

Com esta informação foi feita a comparação entre as amostras das duas coleções onde se pôde verificar uma diferença estatisticamente significativa (Figura 7). Por curiosidade avalei também possíveis diferenças entre o órgão afetado (rim, bexiga e próstata). Os resultados estão apresentados no Anexo III.



*Figura 7 - Comparação da distribuição das concentrações entre coleções. Para esta comparação foram usados os valores das concentrações do DNA extraído a fresco (T0)(N=104). Os valores médios de concentração foram 67 ng/μL e 46 ng/μL para as amostras da coleção de Tumores e de Bioprost, respectivamente. O valor de P obtido (\*) foi <0.0001 calculado através do teste de T com correção de Welch.*

A análise dos rácios não revelou nenhuma diferença entre as coleções.

Uma vez que o objetivo inicial era avaliar apenas a coleção de Tumores e considerando que a coleção BIOPROST, além de ser independente e englobar outras patologias benignas da próstata, apresenta um processamento pré-analítico diferente e menos controlado, decidiu-se eliminar as amostras da coleção BIOPROST nos próximos passos.

### 3.1.3 Avaliação da Estabilidade do DNA Armazenado no Biobanco

De forma a avaliar a influência do tempo de armazenamento na qualidade das amostras, estas foram divididas em 3 grupos de acordo com a data de entrada no Biobanco (armazenadas antes de 2015, em 2016 e em 2017) e de cada grupo foram selecionadas 10 amostras. As 30 amostras de gDNA do grupo T0 foram descongeladas e quantificadas no Infinite 200 PRO *multimode plate reader* (Tecan Group Ltd., Switzerland). Para avaliar a influência do armazenamento no DNA os valores obtidos foram comparados com os valores das mesmas amostras antes de serem armazenadas (Figura 8). Os resultados obtidos mostraram que, tal como acontece com o armazenamento das amostras de ST, apesar de não haver perda significativa de DNA a sua pureza é levemente comprometida.

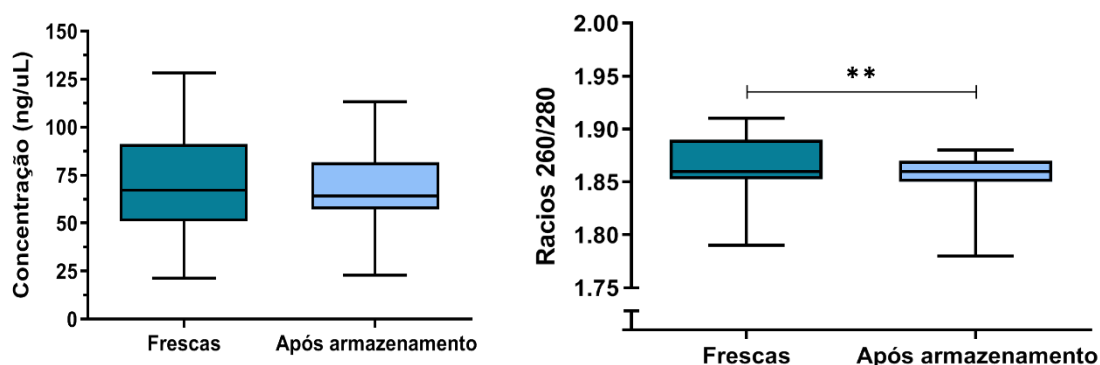
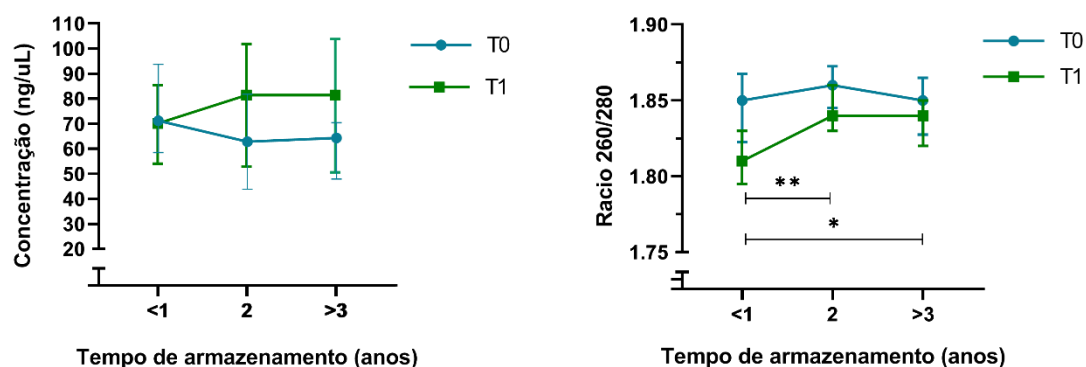


Figura 8 – Distribuição das concentrações (à esquerda) e dos rácios 260/280 (à direita) do DNA extraído do ST a fresco (T0) antes e depois do armazenamento. As médias obtidas para os valores do rácio e da concentração foram 1.87 e 72.35 ng/μL, respetivamente, para as amostras de DNA frescas e 1.85 e 67.03 ng/μL para as amostras congeladas. Estes valores foram comparados através do teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas tendo sido obtidos valores de P de 0,0807 nas concentrações e 0,0036 nos rácios.

### 3.1.4 Avaliação da Estabilidade do DNA em Relação ao Tempo de Armazenamento

Com os valores previamente obtidos das amostras de T0 (10 por tempo de armazenamento no biobanco) e das amostras de T1 (45 <1ano, 30 =2anos e 14 > 3anos) investigou-se se o tempo de armazenamento estaria a interferir na qualidade das amostras armazenadas no Biobanco-iMM.



	<1 ano	2 anos	>3anos		<1 ano	2 anos	>3anos
T0	71.17	62.83	64.33	T0	1.85	1.86	1.85
T1	70.10	81.50	81.50	T1	1.81	1.84	1.84

Figura 9 - Comparação das concentrações (à esquerda) e dos rácios 260/280 (à direita) do DNA extraído a fresco (T0) e do DNA extraído de ST armazenamento (T1) ao longo do tempo de armazenamento a -80°C. Nas tabelas encontram-se os valores das medianas obtidos para cada grupo de amostras. Foram utilizados todos os valores de T1 disponíveis (N=92) para a comparação entre grupos, no entanto para a comparação das amostras de DNA congelado apenas foi utilizado um N=10 para cada ano de armazenamento. As tabelas apresentam os valores das medianas. Os grupos foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

\*P=0.0249; \*\*P=0.0010

Neste caso foi possível verificar que o tempo de armazenamento não revelou diferenças significativas nas concentrações, no entanto as amostras de DNA (T1) apresentam um rácio estatisticamente superior quando extraídas de ST armazenado há mais de um ano (Figura 9). Contudo esta diferença não é relevante uma vez que os valores se mantêm dentro dos parâmetros aceitáveis de qualidade.

### 3.1.5 PCR Quantitativo em Tempo Real

Para confirmar a integridade do DNA e avaliar a sua qualidade para aplicações *downstream* realizou-se um PCR em tempo real<sup>45</sup> dos grupos previamente selecionados.

#### 3.1.5.1 Otimização

Numa primeira fase os dois pares de *primers* foram comparados testando-se diluições seriadas de uma amostra de DNA com uma concentração elevada de forma a obter-se em simultâneo as respetivas curvas de calibração.

Ambos os pares de primers testados apresentaram bons resultados, tendo sido escolhido o par de *primers* FAB2, por ser aquele que apresentava uma  $T_m$  mais baixa (Figura 10).

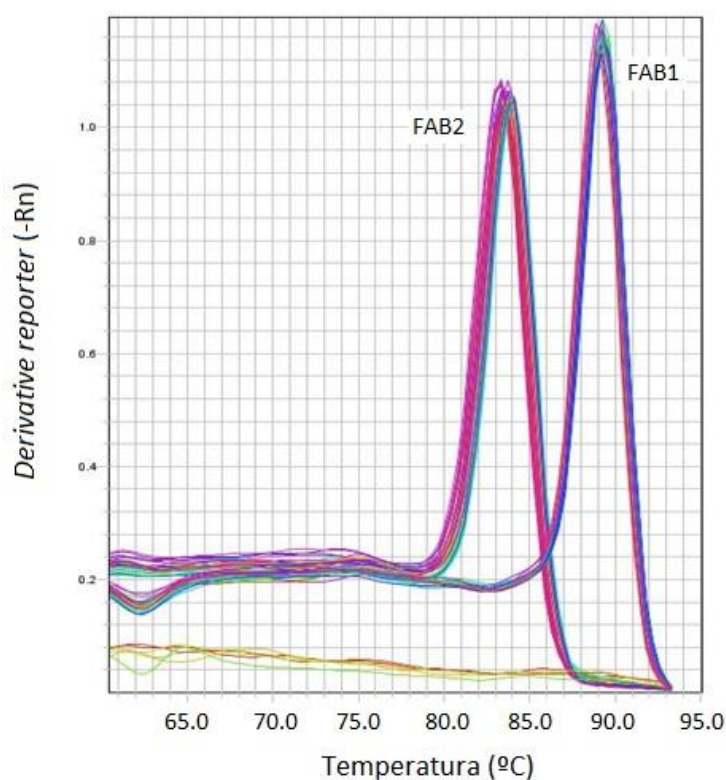
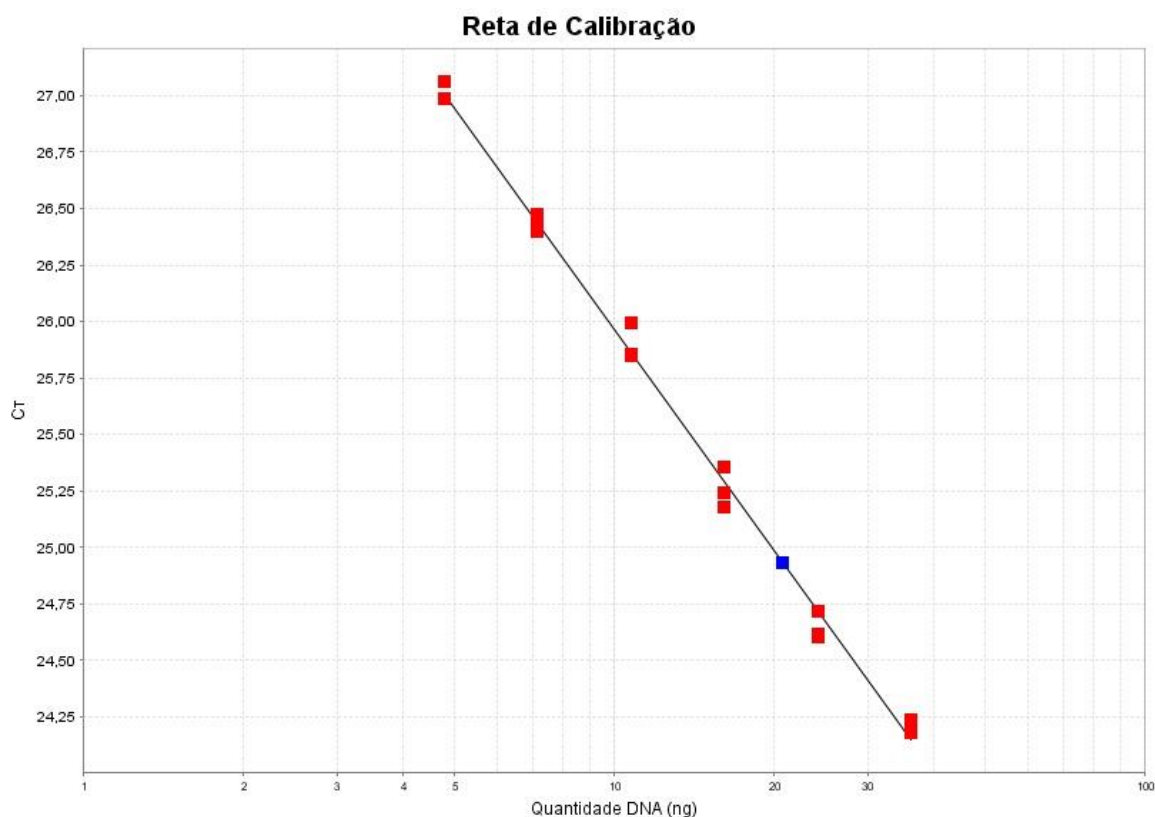


Figura 10 - Curvas de Melting dos pares de primers testados.

Após otimização do protocolo, a reta de calibração adotada encontra-se representada a seguir.



*Figura 11 – Reta de calibração obtida. Os pontos vermelhos representam os standards, analisados em triplicado e o ponto azul representa um controlo interno de qualidade com 10ng/ $\mu$ L de concentração.  
Equação da reta  $y = -3.25[\log(x)] + 29.213$ .  $R^2 = 0.995$ . Eficiência = 103%*

### 3.1.5.2 Análise das amostras

Todas as amostras testadas apresentaram amplificação para o gene *ACVR2B* (Figura 12) e os valores de Ct medianos obtidos foram 25.23 (IQR 25.08-25.41) e 25.16 (IQR 25.04-25.29) para as amostras de DNA extraído a fresco e extraído após armazenamento do ST, respetivamente, comprovando assim a sua integridade e qualidade para aplicações *downstream*.

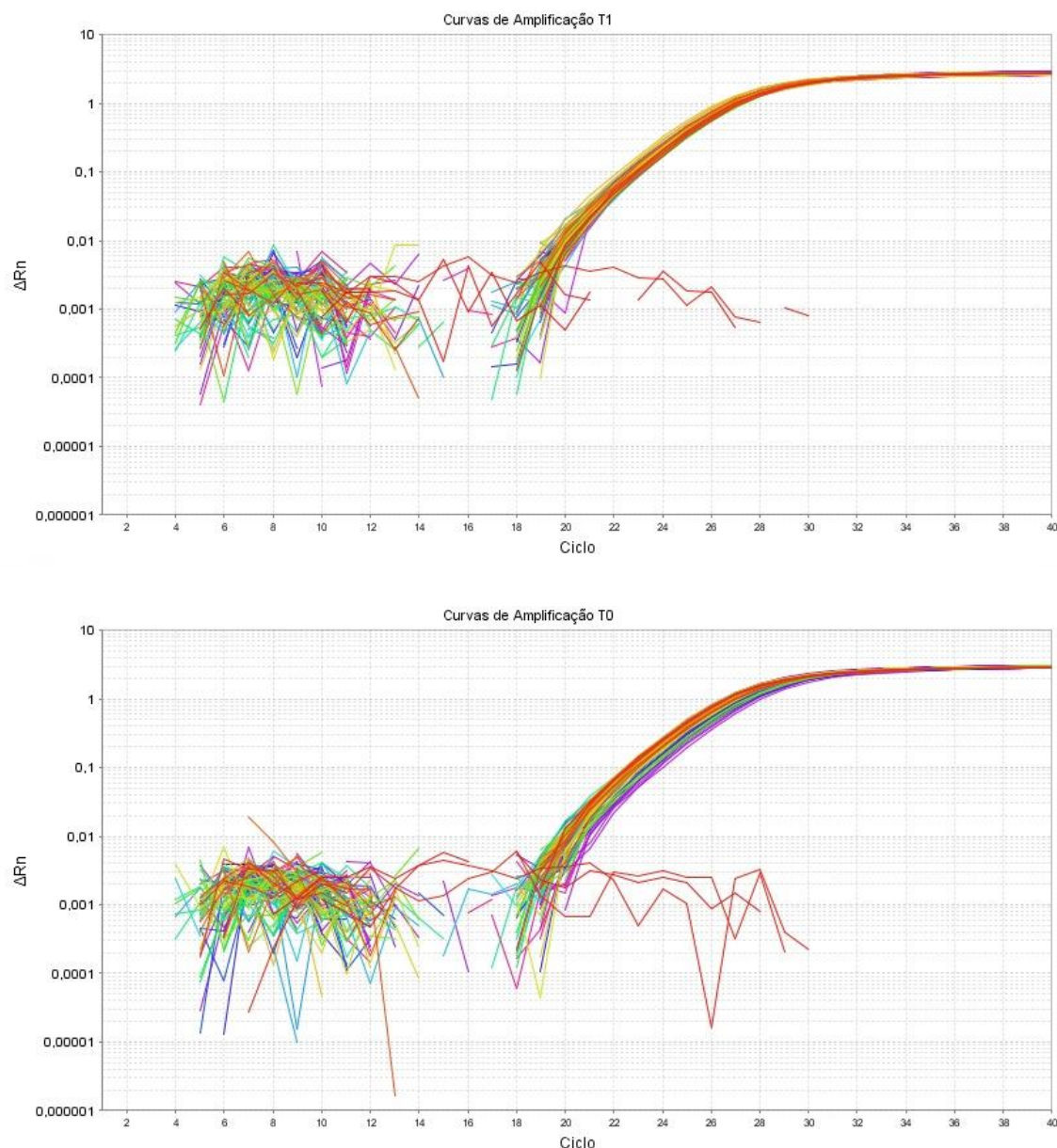


Figura 12 - Curvas de amplificação das amostras T0 (em cima) e T1 (em baixo) selecionadas. O Ct médio das amostras T0 foi de 25.23 e das amostras foi de T1 25.16. Em todas as amplificações foi incluído um controlo positivo (TaqMan™ Control Genomic DNA (human) 10ng/uL).

Com os valores de Ct obtidos e através da equação da reta de calibração previamente determinada, extrapolou-se as quantidades de DNA amplificado em cada amostra. Posteriormente compararam-se estes valores obtidos não se verificando, no entanto, diferenças significativas tanto entre os grupos T0 e T1 como ao longo do tempo de armazenamento (Figura 13). Posto isto, foi possível uma vez mais confirmar que as condições e o tempo de armazenamento não interferem com a concentração, integridade e qualidade do DNA das amostras da coleção de Tumores do Biobanco-iMM, CAML.

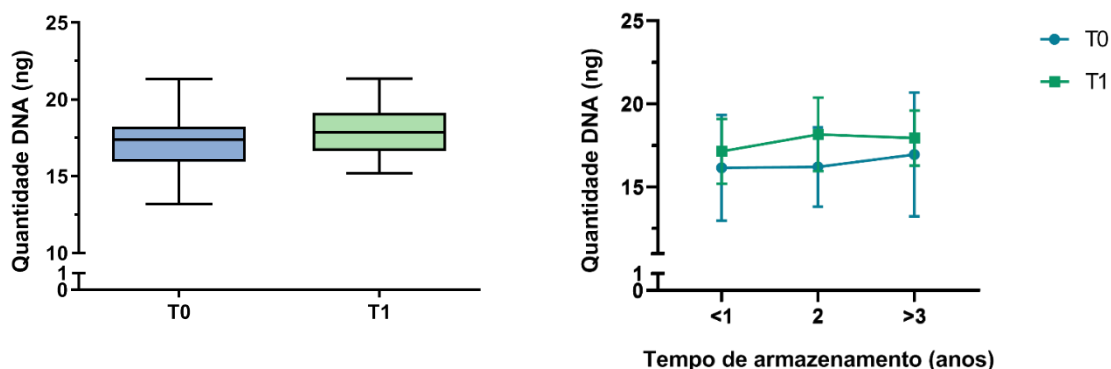


Figura 13 – Comparação da quantidade de DNA amplificado por qPCR entre os grupos T0 e T1 (à esquerda) e ao longo do tempo de armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Valores extrapolados com recurso à reta de calibração da Figura 11. Os grupos T0 e T1 foram comparados com recurso ao teste de T e para comparação das amostras com tempos de armazenamento diferentes recorreu-se ao teste de Kruskal Wallis com correção de Dunn. Em nenhum dos casos foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

### 3.2 Criação de um banco de exossomas

Com o intuito de fornecer à comunidade científica um novo recurso, facilitando a investigação nesta área, procedi ao isolamento de exossomas através do *kit Total Exosome Isolation (from serum)* da Invitrogen, uma forma rápida e simples de isolar exossomas. Para confirmar a presença destas vesículas e a sua qualidade utilizei o *Exo-Check antibody array* da System Biosciences para a análise de 4 amostras. Seguindo as indicações do fabricante, para a realização do *array*, foi necessário proceder-se à realização do ensaio de Bradford de forma a obter-se a concentração de proteínas totais de cada amostra de exossomas selecionada. Para a realização deste ensaio calculou-se a seguinte reta de calibração:

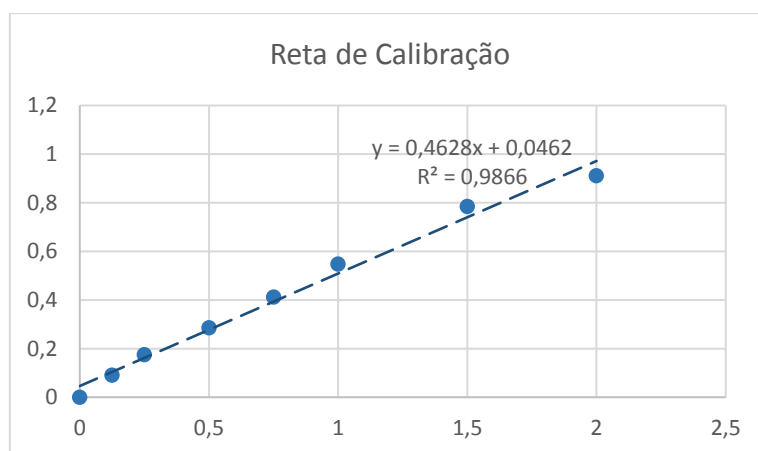
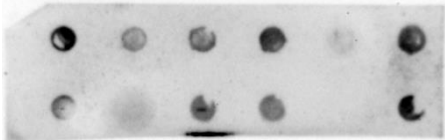
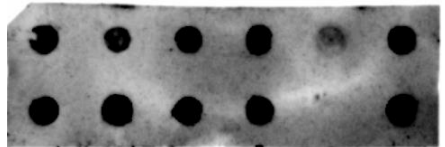
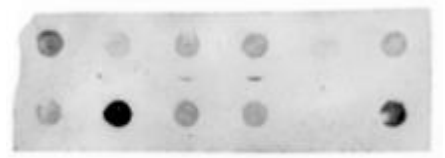
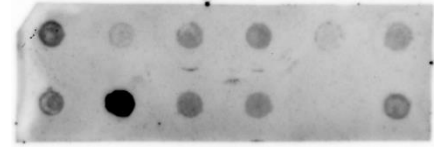


Figura 14- Reta de calibração obtida para quantificação das proteínas totais nas amostras de exossomas.



Os resultados das quantificações das proteínas totais e as imagens dos *arrays* estão apresentados na Tabela 8.

*Tabela 8 – Resultados obtidos no CQ dos exossomas testados. Foram testadas 4 amostras, algumas delas mais do que uma vez devido a problemas na realização dos arrays. Os resultados obtidos, assim como a informação clínica das amostras selecionadas estão descritas nesta tabela. A identificação de cada spot encontra-se na primeira linha da coluna “Arrays”.*

Amostra	Concentração (mg/mL)	Arrays						Idade	Sexo	Patologia
		1	2	3	4	5	6			
		A Positive	GM130	FLOT-1	ICAM	ALIX	CD81			
		B CD63	EpCAM	ANXA5	TSG101	Blank	Positive			
A11612	21,96							62	M	Carcinoma de Células Claras Fuhrman 2, pT4N1, metastizado
A13415	21,69							58	F	Carcinoma de Células Claras Fuhrman 4 pT2a, metastizado
A11359	19,76							32	M	Angiomiolipoma Renal
A15374	15,34							79	F	Oncocitoma

As quantificações das proteínas totais de cada amostra foram ligeiramente superiores nas amostras de doentes com patologias malignas, no entanto este aumento não é significativo.

Como é possível verificar nas imagens da tabela anterior, em todos os *arrays* estão presentes os *spots* do controlo positivo e o controlo negativo não apresenta qualquer marcação. Com isto é possível validar os 4 *arrays* apresentados. No entanto o *spot* GM130 revela alguma contaminação celular em todas as amostras. A marcação nos restantes *spots* confirma a presença de exossomas, sendo que a intensidade de cada um varia de acordo com a expressão do respetivo marcador nos exossomas. O *array* da amostra A13415 está mais escuro, possivelmente devido a alguma ocorrência no procedimento de revelação, podendo não refletir exatamente a expressão dos marcadores. Comparando os restantes *arrays* observa-se uma menor intensidade no *spot* da proteína EpCAM na



amostra A11612, sugerindo uma menor intensidade deste marcador nestes exossomas. Embora este achado vá de encontro ao que é descrito na literatura<sup>32,46</sup> o número de amostras não é suficiente para tirar conclusões.

### 3.3 Enriquecimento e Enumeração de CTCs

O terceiro objetivo deste projeto era a implementação de um novo serviço de enriquecimento de CTCs. Para isso foram comparados dois *kits* da *StemCell Technologies*: o *EasySep™ Direct Human CTC Enrichment Kit* e o *RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail* com Anti-CD56.

#### 3.3.1 Comparação dos *kits* de enriquecimento

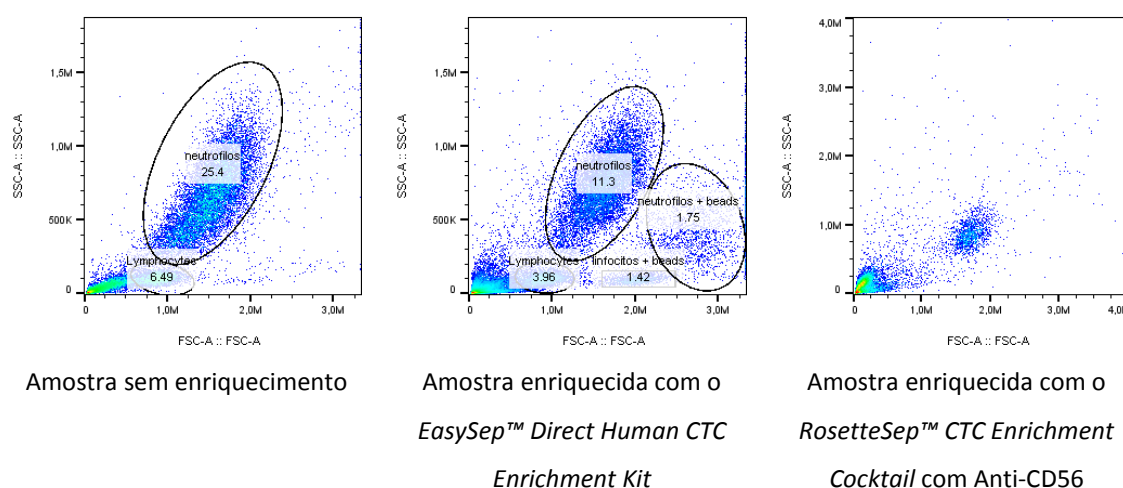


Figura 15 - Gráficos biparamétricos com os resultados de citometria de fluxo. Representam as populações celulares presentes, mediante o tamanho (FFC) e a granularidade (SSC) de cada célula.

Apenas com a análise das populações celulares em FFCxSSC foi possível verificar a contaminação da amostra enriquecida pelo *Kit EasySep* não só com leucócitos, como possivelmente com as microesferas magnéticas (Figura 15, *dot plot* central, população mais à direita). Estas populações são bastante mais reduzidas na amostra enriquecida com o *kit RosetteSep*. Mediante esta observação, todas as amostras processadas foram posteriormente enriquecidas com recurso ao *RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail* com *Anti-CD56*.

### 3.3.2 Otimização do painel de marcações para citometria de fluxo

Para a devida análise das amostras enriquecidas recorreu-se à citometria de fluxo. Para a otimização do painel de marcação recorreu-se às linhas celulares MDA-MB-231 e MCF7 que revelaram, no entanto, marcações ténues mesmo após a compensação do citómetro.

Na Figura 16 é possível verificar que a marcação para EpCAM e para CK nas células MCF7 é muito fraca e que a marcação para CD45, que deveria ser negativa, é ligeiramente mais intensa comparando com as células não marcadas.

Na Figura 17 não se verifica marcação significativa para Vimentina, marcador que deverá estar presente nas células MDA-MB-231.

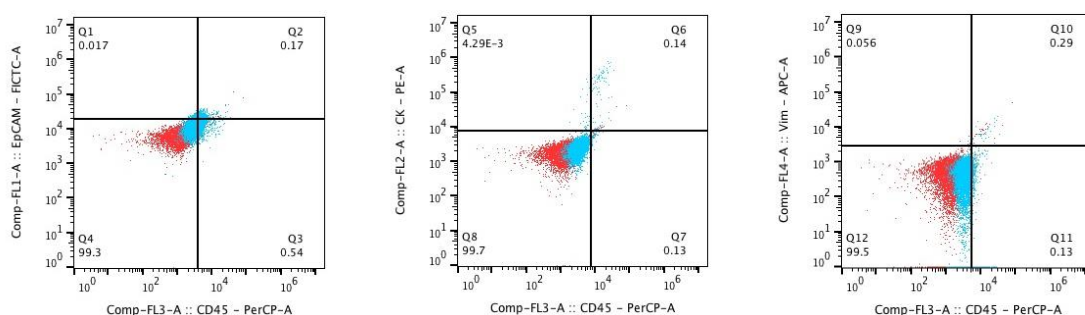


Figura 16 – Resultados da marcação das células MCF7. Vermelho – Células não marcadas; Azul – células marcadas.

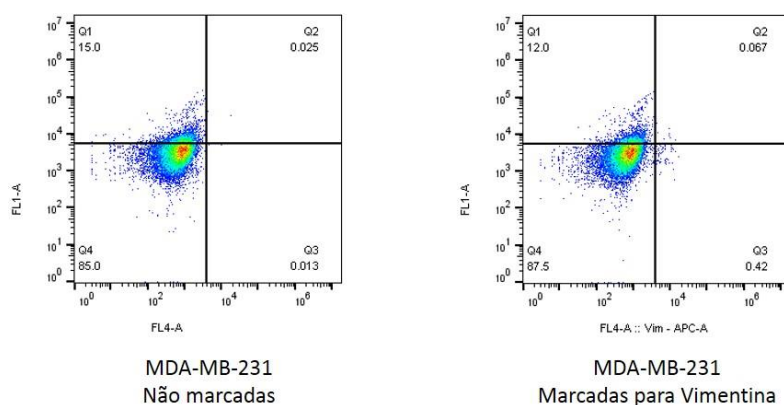


Figura 17 – Resultados da análise por citometria da marcação das células MDA-MB-231. Apenas algumas células apresentaram fluorescência para Vimentina, contrariando o esperado.

### 3.3.3 Enriquecimento e análise de amostras de doentes

Como referido anteriormente, a otimização não foi, globalmente satisfatória. Com isto, e com a baixa prevalência de CTCs no sangue a análise das amostras de pacientes revelou-

se infrutífera, uma vez que praticamente não foram detetadas células CD45<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> nem CD45<sup>-</sup> Vim<sup>+</sup> (Figura 18).

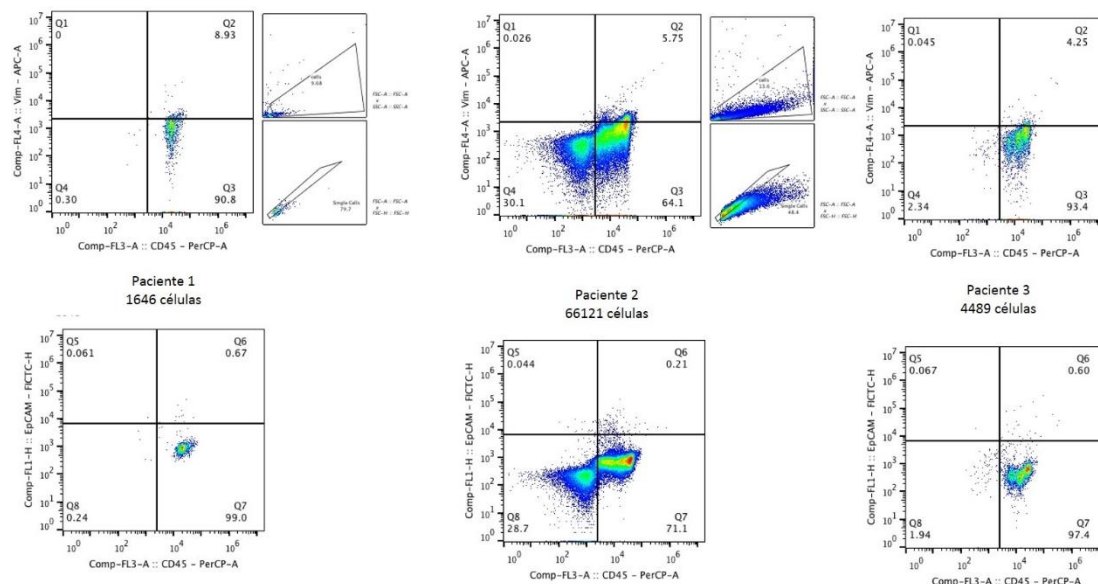


Figura 18 - Resultados da análise por citometria da marcação das amostras de 3 doentes oncológicos.

## 4. Discussão

O objetivo deste estudo foi a criação de novas ofertas por parte do Biobanco-iMM à comunidade científica e a avaliação da qualidade dos seus produtos na área das biópsias líquidas, nomeadamente, em tumores urogenitais.

Os resultados obtidos indicam que as amostras armazenadas no Biobanco-iMM apresentam a qualidade e reprodutibilidade desejada e adequada para serem utilizadas na investigação biomédica.

### 4.1 Avaliação da estabilidade do gDNA

Os resultados obtidos ao longo deste projeto indicam claramente que as amostras de DNA armazenadas no Biobanco, tanto sob a forma de gDNA como sob a forma de ST, cumprem os requisitos de qualidade e vão de encontro aos padrões alcançados em outros biobancos.<sup>45</sup> Os valores obtidos dos rácios A260/A280 para a maioria das amostras

variaram entre 1,8 e 2, encontrando-se dentro dos valores de qualidade e indicando um grau de pureza aceitável e adequado à maioria das aplicações *downstream*.<sup>45,47</sup>

Os valores de concentração obtidos nas amostras de DNA extraído do ST armazenado demonstraram que o rendimento da extração não é afetado pelo tempo de armazenamento a -80°C. No entanto verifica-se uma diminuição dos valores dos rácios A260/A280 após o armazenamento, quer nas amostras de DNA extraído a fresco quer nas amostras de DNA extraído após armazenamento do ST. Esta diminuição não é, no entanto relevante em termos de pureza uma vez que os valores se encontram na sua maioria acima de 1.8, valor a partir do qual o DNA é considerado livre de proteínas ou outros contaminantes.<sup>45</sup>

Em relação ao tempo de armazenamento, é possível verificar uma diferença significativa nos valores dos rácios A260/A280 nas amostras de DNA extraído de ST a partir do primeiro ano de armazenamento, no entanto esta diferença não será muito relevante uma vez que os valores observados se encontram dentro dos parâmetros aceitáveis e a alteração verificada é um aumento do valor médio. Estas alterações nos rácios podem ser devidas apenas a variações na realização do controlo de qualidade nomeadamente variações associadas ao operador.

Sendo a análise das absorvâncias limitada ao controlo do rendimento e da pureza da amostra, é necessário recorrer a outros métodos para avaliar a integridade do DNA de forma a comprovar a sua qualidade para aplicações *downstream*.<sup>45</sup> Para isso recorreu-se à realização de um gel eletroforese em agarose 1% que revelou bandas de alto peso molecular bem definidas e ausência de bandas de menor peso molecular ou arrastamento que pudessem indicar degradação ou contaminação.

Para completar o controlo de qualidade realizou-se um *real time PCR* de um gene específico, uma boa ferramenta para avaliar a integridade e adequabilidade para análises *downstream* das amostras de DNA.<sup>45</sup> Os resultados desta análise confirmaram sua a qualidade para utilização em testes genómicos.

#### 4.1.1 Comparação das amostras entre coleções

Entre as amostras das coleções de Tumores e Bioprost verifica-se uma diferença significativa nas concentrações de DNA que poderá ser justificada pelas condições pré-analíticas a que são submetidas as amostras entre a colheita e a receção pelo Biobanco-iMM: as amostras da coleção de Tumores cumprem condições pré-analíticas mais exigentes, ou seja, são armazenadas a 4°C imediatamente após colheita e até recolha pelo pessoal do Biobanco-iMM no Bloco Cirúrgico do Hospital Santa Maria cumprindo assim as exigências mais rigorosas<sup>3,45,48</sup>, enquanto as amostras do BIOPROST são recolhidas na Central de Colheitas do Hospital Santa Maria onde ficam à TA durante períodos não controlados até à recolha pelo *staff* do Biobanco-iMM.

Comparando os valores obtidos neste projeto com os valores obtidos numa análise de Controlo de Qualidade prévio realizado pelo Biobanco-iMM (Anexo IV)<sup>49</sup> é possível verificar que as amostras da coleção BIOPROST estão de acordo com o intervalo de valores do *pool* geral de amostras do Biobanco-iMM.

Outra explicação possível para as concentrações superiores de DNA das amostras da coleção de tumores é a presença frequente de uma resposta inflamatória aumentada, nomeadamente a presença de neutrofilia, observada em diversos tipos de tumores (incluindo tumores renais e de bexiga)<sup>50</sup>.

Estas diferenças poderão ser investigadas de forma a, sendo o caso, se poder melhorar as condições pré-analíticas de todas as amostras do Biobanco-iMM.

#### 4.2 Criação de um banco de exossomas

Apesar do crescente interesse nos exossomas como biopsia líquida, verifica-se ainda uma grande dificuldade no estabelecimento de critérios de classificação e nomenclatura das vesículas extracelulares. As técnicas de isolamento, deteção e armazenamento dos exossomas é outra área que precisa ainda de otimização e *standardização*. É aqui que os biobancos desempenham um papel de relevância: na capacidade de suportar estudos direccionados à comparação de técnicas de isolamento e de deteção e de protocolos de armazenamento, permitindo o estabelecimento de guidelines<sup>23</sup>

No âmbito deste projeto foram isolados exossomas de todas as amostras de soro de doentes com patologias oncológicas do rim, bexiga e próstata, identificadas e disponíveis no Biobanco-IMM no início do projeto. Uma pequena amostra destes exossomas isolados foi submetida a um CQ que demonstrou não só a sua presença como a possibilidade de identificar marcadores existentes, mesmo após um e dois ciclos de congelamento/descongelamento a -80°C. Apesar destes aspetos positivos verificou-se também que os exossomas isolados apresentam sempre contaminação por restos celulares. Para melhor compreender os efeitos do armazenamento será recomendado realizar testes comparativos entre amostras frescas e amostras armazenadas.

As 4 amostras submetidas ao CQ foram escolhidas entre as amostras de rim, sendo que duas eram metastáticas e duas de tumores benignos. A ideia inicial era verificar se poderia haver alguma relação entre a expressão dos exossomas e o tipo/estadiamento da doença. No entanto o número de amostras não permitiu tirar qualquer conclusão a este respeito.

Uma vez que os testes realizados utilizam lisados de exossomas, não demonstram a influência do armazenamento no número total de exossomas, na existência de agregados e em características como o tamanho, a estrutura e a funcionalidade, parâmetros usualmente afetados e demonstrados em estudos anteriores.<sup>51,52</sup>

No fim deste projeto ficou à disposição da comunidade científica um banco de exossomas com potenciais aplicações e qualidade demonstrada. Validou-se também um método de isolamento simples possibilitando mais um serviço prestado pelo Biobanco-iMM ao investigador e demonstrou-se a possibilidade de isolar exossomas de amostras de soro armazenado até 4 anos.

### 4.3 Enriquecimento e Enumeração de CTCs

Com o crescente interesse nas células tumorais circulantes e na sua potencial utilização na investigação translacional, a sua criopreservação proporcionaria novas oportunidades de investigação nomeadamente em estudos retrospectivos e em grandes ensaios clínicos. Vários estudos foram já realizados onde foi possível recuperar CTCs de amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) criopreservadas sem impacto significativo no número e na morfologia das CTCs nem nos seus biomarcadores<sup>28-31</sup> no

entanto ainda não existem estudos de criopreservação de CTCs puras possivelmente devido aos seus baixos números presentes no sangue. Sendo a criopreservação de CTCs puras um objetivo demasiado ambicioso, o objetivo deste projeto era apenas selecionar um método de enriquecimento que permitisse ao biobanco fornecer mais um serviço e, num futuro, estudar a possibilidade de armazenar as CTCs enriquecidas. Para isso foram selecionados e comparados dois *kits* de enriquecimento da *StemCell Technologies*. Nesta comparação verificou-se que o *kit* mais eficaz e com menos contaminação por outros elementos celulares sem interesse foi o *kit RosetteSep*.

Na análise das amostras dos pacientes não foi possível identificar inequivocamente as CTCs. Esta dificuldade poderá ser resultante de inúmeros fatores como problemas no enriquecimento, má otimização da marcação ou simplesmente pelo facto de estas células serem muito raras na corrente sanguínea (<5 CTCs por 7,5mL)<sup>33</sup> e da sua análise requerer perícia, tempo e recursos especializados<sup>28</sup>.

## 5. Conclusão

Um projeto de investigação exige um considerável período de tempo a planear e a implementar um circuito de forma a obter um número significativo de amostras biológicas e a respetiva informação clínica. É neste contexto que os biobancos, entidades facilitadoras do acesso a amostras de qualidade e à respetiva informação clínica, ganham importância. Isto porque não só diminuem significativamente o tempo de obtenção de amostras e respetivos dados clínicos como garante todas as questões éticas e legais, melhorando a eficácia da investigação. Neste sentido, o Biobanco-iMM, CAML oferece-se sempre para, por um lado, desenvolver e implementar, junto com os investigadores e os profissionais de saúde, circuitos de obtenção de amostras e, por outro, garantir a qualidade das amostras oferecidas.

Com este projeto foi possível estabelecer uma melhor dinâmica com o serviço de Urologia, nomeadamente com o Bloco Operatório, evidenciada na obtenção de mais amostras de interesse, enriquecendo assim a coleção de tumores urológicos do Biobanco-iMM. Esta dinâmica passa pelo conhecimento pelo Biobanco-iMM do planeamento semanal das

cirurgias de forma a permitir uma melhor organização em laboratório para a receção das mesmas. O circuito de colheita e transporte foi estabelecido com um maior rigor, melhorando assim as condições pré-analíticas e, consequentemente, a qualidade das amostras recebidas. Para isto toda a equipa envolvida na colheita foi sensibilizada, havendo agora a partilha semanal do planeamento de cirurgias para colheita de amostras de interesse para o biobanco, o contacto imediato do Biobanco-iMM quando a amostra está pronta e o armazenamento da mesma a 4°C imediatamente após a colheita e até à recolha e processamento pelo *staff* do Biobanco-iMM.

Verificou-se uma vez mais o cumprimento dos padrões de exigência e qualidade do Biobanco-iMM nas amostras de DNA armazenadas. Foi também criada uma nova oferta à comunidade científica – o banco de exossomas. Esta realização permitirá não só a oferta de amostras de exossomas uniformizadas tanto no isolamento como no armazenamento, como também poderá estimular o desenvolvimento de estudos direccionados à comparação de técnicas de isolamento e deteção de exossomas e de protocolos de armazenamento, permitindo o estabelecimento de *guidelines*.

Por todos os aspetos alcançados espero que este trabalho, através do enriquecimento da coleção de tumores urológicos, estimule novos projetos, nomeadamente nas patologias do rim e bexiga, tanto na investigação básica como na medicina translacional e de precisão.

O interesse agora será a divulgação da coleção de tumores e da nova disponibilidade das biópsias líquidas de rim e bexiga, particularmente a existência do banco de exossomas. Seria também importante comprovarmos a utilização e a qualidade dos exossomas armazenados com a aplicação prática dos mesmos em estudos de qualidade mais aprofundados, quer com parcerias com outros investigadores, quer com a realização de protocolos já realizados de forma a comparar os resultados.



## Bibliografia

1. Silva VG. Implementação de um método de validação do controlo de qualidade em amostras de DNA armazenadas no Biobanco-IMM. 2014.
2. Rede Nacional de Bancos de Tumores. Requisitos mínimos para o estabelecimento de um banco de tumores. <http://rnbt-si.org/pls/apex/f?p=137:2:0::NO>. Published 2013. Accessed December 13, 2017.
3. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). *Best Practices for Repositories: Collection, Storage, Retrieval, and Distribution of Biological Materials for Research*. 3rd ed.; 2011. doi:10.1089/bio.2012.1022.
4. Elger BS, Caplan AL. *Consent and Anonymization in Research Involving Biobanks: Differing Terms and Norms Present Serious Barriers to an International Framework*; 2006.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1500833/pdf/7400740.pdf>.
5. Riegman PHJ, Morente MM, Betsou F, de Blasio P, Geary P. Biobanking for better healthcare. *Mol Oncol*. 2008;2(3):213-222. doi:10.1016/J.MOLONC.2008.07.004.
6. Riegman PHJ, Dinjens WNM, Oosterhuis JW. Biobanking for Interdisciplinary Clinical Research. *Pathobiology*. 2007;74(4):239-244. doi:10.1159/000104451.
7. Biobanco-iMM. *2016 Annual Report*. Lisbon; 2012. <http://biobanco-imm.biobanco.pt/index>.
8. Afonso Â. Identification of biomarkers for quality control in human biological serum samples. 2014.
9. Polido-Pereira J. Biobanking and Cancer - Onconet Sudoe. 2017.
10. Afonso Â. SOP.BIO.001 GENERAL PROCEDURE. 2016.
11. Afonso Â. SOP.BIO.003 BIOLOGIC FLUID SAMPLES PROCESSING. 2017:1-7.
12. Afonso Â. SOP.BIO.004 DNA EXTRACTION. 2017:1-5.

13. NCI Dictionary of Cancer Terms. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=779095>. Accessed January 18, 2018.
14. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: A step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer*. 2017;16(1):1-14. doi:10.1186/s12943-017-0644-5.
15. ESMO. How Different Forms of Liquid Biopsies Can Be Exploited to Guide Patient Care? <http://www.esmo.org/Oncology-News/How-Different-Forms-of-Liquid-Biopsies-Can-Be-Exploited-to-Guide-Patient-Care>. Published 2017. Accessed January 18, 2018.
16. Griffiths L, Chacon-Cortes D. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *J Biorepository Sci Appl Med*. 2014;2:1. doi:10.2147/BSAM.S46573.
17. Hassan S, AbRahman W, WAhmad W, Mohamad S, Hassan R, Ghazali S. *DNA Yield and Concentration Modeling by Age, A260/280 and A260/230 Ratios Using Multiple Linear Regression (MLR), Bootstrap and Response Surface Methodology (RSM)*. Vol 4.; 2016. doi:10.21474/IJAR01/655.
18. Cowin PA, Anglesio M, Etemadmoghadam D, Bowtell DDL. Profiling the Cancer Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11(1):133-159. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141536.
19. Nacional Cancer Institute. The Genetics of Cancer. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics#syndromes>. Published 2017. Accessed March 5, 2018.
20. Franzen CA, Blackwell RH, Foreman KE, Kuo PC, Flanigan RC, Gupta GN. Urinary exosomes: The potential for biomarker utility, intercellular signaling and therapeutics in urological malignancy. *J Urol*. 2016;195(5):1331-1339. doi:10.1016/j.juro.2015.08.115.

21. Junker K, Heinzelmann J, Beckham C, Ochiya T, Jenster G. Extracellular Vesicles and Their Role in Urologic Malignancies. *Eur Urol.* 2016;70(2):323-331. doi:10.1016/j.eururo.2016.02.046.
22. Chia BS, Low YP, Wang Q, Li P, Gao Z. Advances in exosome quantification techniques. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2017;86:93-106. doi:10.1016/j.trac.2016.10.012.
23. Mora EM, Álvarez-Cubela S, Oltra E. Biobanking of Exosomes in the Era of Precision Medicine: Are We There Yet? *Int J Mol Sci.* 2015.
24. Zhou L, Dicker DT, Matthew E, El-Deiry WS, Alpaugh RK. Circulating tumor cells: silent predictors of metastasis. *F1000Research.* 2017;6(0):1445. doi:10.12688/f1000research.11313.1.
25. Huguenin CM, Zainfeld DE, Goldkorn A. Circulating Tumor Cells in Genitourinary Malignancies: An Evolving Path to Precision Medicine. *Front Oncol.* 2017;7(January):1-10. doi:10.3389/fonc.2017.00006.
26. Chen L, Bode AM, Dong Z. Circulating tumor cells: Moving biological insights into detection. *Theranostics.* 2017;7(10):2606-2619. doi:10.7150/thno.18588.
27. Mesquita B, Rothwell DG, Burt DJ, et al. Molecular analysis of single circulating tumour cells following long-term storage of clinical samples. *Mol Oncol.* 2017;11:1687-1697. doi:10.1002/1878-0261.12113.
28. Brungs D, Lynch D, Luk AWS, et al. Cryopreservation for delayed circulating tumor cell isolation is a valid strategy for prognostic association of circulating tumor cells in gastroesophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2018;24(7):810-818. doi:10.3748/wjg.v24.i7.810.
29. Nejlund S, Smith J, Kraan J, et al. Cryopreservation of Circulating Tumor Cells for Enumeration and Characterization. *Biopreserv Biobank.* 2016;0(0):1-8. doi:10.1089/bio.2015.0074.
30. Lu D, Graf RP, Harvey M, Madan RA. Detection and Characterization of Circulating

- Tumour Cells from Frozen Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Circ Biomarkers*. 2015. doi:10.5772/60745.
31. Zhu P, Stanton ML, Castle EP, Joseph RW. Detection of Tumor-associated Cells in Cryopreserved Perilheral Blood Mononuclear Cell Samples for Retrospective Analysis. *J Transl Med*. 2016. doi:10.1186/s12967-016-0953-2.
  32. Gorin MA, Verdone JE, Toom E van der, Bivalacqua TJ, Allaf ME, Pienta KJ. Circulating tumour cells as biomarkers of prostate, bladder, and kidney cancer. *Nat Reviwes*. 2016. doi:10.1038/nrurol.2016.224.
  33. Toom EE Van Der, Verdone JE, Gorin MA, Kenneth J. Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells. *Oncotarget*. 2016;7(38).
  34. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016;10:374-394. doi:10.1016/j.molonc.2016.01.007.
  35. Labajo RMP. (NC-PE-000019-002) Long PCR Múltiple. 2011:1-7.
  36. The Human Protein Atlas. ACVR2B.
  37. Thermo Fisher Scientific. PowerUp SYBR Green Master Mix User Guide. 2016.
  38. Invitrogen. Total Exosome Isolation (from serum). 2012;(June).
  39. System Biosciences. Exosome Antibodies, Array & ELISA Kits - User Manual. 2016.
  40. Stem Cell Technologies. Isolation of Circulating Tumor Cells. 2017. <https://www.stemcell.com/isolation-of-circulating-tumor-cells.html>.
  41. Souza LM, Robertson BM, Robertson GP. Future of Circulating Tumor Cells in the Melanoma Clinical and Research Laboratory Setting. *Cancer Lett*. 2017.
  42. Stem Cell Technologies. Sample Preparation Directions for Use – Manual EasySep™ Protocols. [www.stemcell.com/PIS](http://www.stemcell.com/PIS).
  43. Stem Cell Technologies. RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail Containing Anti-

- CD56. <https://www.stemcell.com/products/rosettesep-ctc-enrichment-cocktail-containing-anti-cd56.html>. Accessed January 17, 2019.
44. Martowicz A, Spizzo G, Gastl G, Untergasser G. Phenotype-dependent effects of EpCAM expression on growth and invasion of human breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2012. doi:10.1186/1471-2407-12-501.
  45. Calleros-Basilio L, Cortés MA, García-Jerez A, Luengo-Rodríguez A. Quality Assurance of Samples and Processes in the Spanish Renal Research Network ( REDinREN ) Quality Assurance of Samples and Processes in the. *Biopreserv Biobank*. 2016;(January 2017). doi:10.1089/bio.2015.0095.
  46. Massari F Di, Nunno V, Comito F, et al. Circulating tumor cells in genitourinary tumors. *Ther Adv Urol*. 2018;10(2):65–77. doi:doi.org/10.1177/1756287217742564.
  47. Banco Nacional de ADN - Carlos III. Curso “Gestión de un Biobanco y Técnicas Empleadas.” In: Salamanca U de, ed.
  48. Elliott P, Peakman TC. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection , processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol*. 2008;234-244. doi:10.1093/ije/dym276.
  49. Ferreira S, Rodrigues F, Afonso Â, Dias S, Polido-Pereira J. Biobanco-iMM quality assurance - Factors Involved. *Glob Biobank Week - Stocholm, Sweeden*. 2017.
  50. Mbeutcha A, Shariat SF, Rieken M, et al. Prognostic significance of markers of systemic inflammatory response in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2016;34(11):483.e17-483.e24. doi:10.1016/j.urolonc.2016.05.013.
  51. Maroto R, Zhao Y, Jamaluddin M, Popov VL, Wang H. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1). doi:10.1080/20013078.2017.1359478.
  52. Lórinicz ÁM, Timár CI, Marosvári KA, Veres DS. Effects of Storage on Physical and

Functional Properties of Extracellular Vesicles Derived from Neutrophilic Granulocytes. *J Extracell Vesicles*. 2014.

53. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. *BEST (Biomarkers, EndpointS, other Tools) Resour.* 2017;(Md). doi:10.1164/rccm.201301-0153OC.

## ANEXOS





## PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix

Universal 2X master mix for real-time PCR workflows

Catalog Numbers A25741, A25742, A25743, A25776, A25777, A25778, A25779, A25780, A25918

Pub. No. 100031508 Rev. D.0



**WARNING!** Read the Safety Data Sheets (SDGs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDGs) are available from [thermofisher.com/support](https://www.thermofisher.com/support).

This Quick Reference is intended as a benchtop reference for experienced users of PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix. For detailed instructions, supplemental procedures, and troubleshooting, refer to the *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix User Guide* (Pub. No. MAN0013511).

### Guidelines

#### Input DNA template requirements

Use 1–10 ng single-stranded cDNA or 10–100 ng gDNA per reaction.

#### PCR reactions

- Four replicates of each reaction are recommended.
- Reaction mixes can be prepared depending upon experimental requirements. Scale the components according to the number of reactions and include 10% overage.
- If using smaller reaction volumes, scale all components proportionally. Reaction volumes <10 µL are not recommended.

#### Using NTC controls

No template control (NTC) reactions can be used to identify PCR contamination. NTC reactions contain all reaction components (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, primers, water) except sample, and therefore should not return a C<sub>T</sub> value.

### Methods

#### Set up the PCR reactions

1. Prepare the appropriate number of reactions, plus 10% overage.

Component	Volume (10 µL/well)	Volume (20 µL/well)
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X)	5 µL	10 µL
Forward and reverse primers <sup>[1]</sup>	Variable	Variable
DNA template + Nuclease-Free Water <sup>[2]</sup>	Variable	Variable
<b>Total</b>	<b>10 µL</b>	<b>20 µL</b>

<sup>[1]</sup> For optimal performance in Fast and Standard modes, use 300–800 nM for each primer.

<sup>[2]</sup> Use 1–10 ng cDNA or 10–100 ng gDNA for each reaction.

2. Mix the components thoroughly, then centrifuge briefly to spin down the contents and eliminate any air bubbles.
3. Transfer the appropriate volume of each reaction to each well of an optical plate.
4. Seal the plate with an optical adhesive cover, then centrifuge briefly to spin down the contents and eliminate any air bubbles.

PCR can be performed on the reaction plate up to 24 hours after completing the set-up, when stored at room temperature.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

## Set up and run the real-time PCR instrument

1. Place the reaction plate in the real-time PCR instrument.
2. Set the thermal cycling conditions using the default PCR thermal cycling conditions specified in the following tables according to the instrument cycling parameters and melting temperatures of the specific primers.

**Note:** Standard cycling conditions are recommended for genomic DNA templates. Use only standard cycling conditions for the 7900HT Real-Time PCR Instrument.

**Table 1** Fast cycling mode (primer  $T_m \geq 60^\circ\text{C}$ )

Step	Temperature	Duration	Cycles
UDG activation	50°C	2 minutes	Hold
Dual-Lock™ DNA polymerase	95°C	2 minutes	Hold
Denature	95°C	1 second <sup>[1]</sup> or 3 seconds <sup>[2]</sup>	40
Anneal/extend	60°C	30 seconds	

<sup>[1]</sup> When using a QuantStudio™ Real-Time PCR System or a Viia™ 7 Real-Time PCR System.

<sup>[2]</sup> When using a 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOnePlus™ Real-Time PCR System, or StepOne™ Real-Time PCR System.

**Table 2** Standard cycling mode (primer  $T_m \geq 60^\circ\text{C}$ )

Step	Temperature	Duration	Cycles
UDG activation	50°C	2 minutes	Hold
Dual-Lock™ DNA polymerase	95°C	2 minutes	Hold
Denature	95°C	15 seconds	40
Anneal/extend	60°C	1 minute	

**Table 3** Standard cycling mode (primer  $T_m < 60^\circ\text{C}$ )

Step	Temperature	Duration	Cycles
UDG activation	50°C	2 minutes	Hold
Dual-Lock™ DNA polymerase	95°C	2 minutes	Hold
Denature	95°C	15 seconds	40
Anneal	55–60°C <sup>[1]</sup>	15 seconds	
Extend	72°C	1 minute	

<sup>[1]</sup> Anneal temperature should be set to the melting point for your primers.

3. Set the instrument to perform a default dissociation step.

A dissociation step can be performed up to 72 hours after the real-time PCR run if the plate is stored in the dark and up to 24 hours after the real-time PCR run if the plate is exposed to light.

**Table 4** Dissociation curve conditions (melt curve stage)

Step	Ramp rate	Temperature	Time
1	1.6°C/second	95°C	15 seconds
2	1.6°C/second	60°C	1 minute
3 <sup>[1]</sup>	0.15°C/second	95°C	15 seconds

<sup>[1]</sup> Dissociation

Use the following settings for Applied Biosystems™ instruments:

- Experiment type: Standard curve
- Reagent: SYBR™ Green reagents
- Reporter: SYBR™
- Quencher: None
- Passive reference dye: ROX™
- Ramp speed: Standard or fast (choose the same setting as in step 2)
- Melt curve ramp increment: Continuous

4. Set the reaction volume appropriate for the type of plate being used for your PCR reaction.
5. Start the run.

## Analyze results

1. View the amplification plots.
2. Calculate the baseline and threshold cycles ( $C_T$ ) for the amplification curves using the instrument software.
3. Check for nonspecific amplification using dissociation curves.
4. Perform relative or absolute quantitation.



**Manufacturer:** Thermo Fisher Scientific Baltics UAB | V.A. Graiciuno 8, LT-02241 | Vilnius, Lithuania

The information in this guide is subject to change without notice.

**DISCLAIMER:** TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

**Important Licensing Information:** This product may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of this product, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2019 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

[thermofisher.com/support](https://thermofisher.com/support) | [thermofisher.com/askaquestion](https://thermofisher.com/askaquestion)

[thermofisher.com](https://thermofisher.com)

26 August 2019

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

## Anexo II – Descrição do conteúdo dos *arrays* Exo-Check

Identificação	Descrição	Link para EXOCARTA para proteínas humanas
CP	Controlo Positivo para deteção da peroxidase de rábano (HRP) (derivado de exossomas humanos)	NA
Branco	Controlo Negativo	NA
GM130	Proteína da matriz cis-golgi - controlo da contaminação celular na preparação dos exossomas	NA
FLOT1	Flotillina-1 – Proteína de membrana (intracelular) envolvida no tráfego vesicular e na morfologia celular.	<a href="#">ExoCarta 10211</a>
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1 – Proteína de membrana (de superfície) que permite a ligação entre células vizinhas.	<a href="#">ExoCarta 3383</a>
ALIX	Proteína interativa 6 de morte celular programada (PDCD6IP) – participa na fase de clivagem da citocinese, na formação de vesículas endossómicas intraluminais e na formação de vírus envelopados.	<a href="#">ExoCarta 10015</a>
CD81	Proteína de membrana (superfície) pertencente à família das Tetraspaninas. Está envolvida na fusão de células musculares, no suporte da manutenção de miotubos e na transdução de sinal.	<a href="#">ExoCarta 93185</a>

**Identificação    Descrição**

**Link para EXOCARTA  
para proteínas humanas**

CD63	Proteína de membrana (superfície) pertencente à família das Tetraspaninas. Pensa-se estar associada à ativação plaquetária e à progressão tumoral.	<a href="#">ExoCarta_967</a>
------	--	------------------------------

EpCAM	Molécula de adesão celular epitelial; frequentemente encontrado em exossomas derivados de células do cancro.	<a href="#">ExoCarta_4072</a>
-------	--	-------------------------------

ANXA5	Anexina A5 - proteína inibidora da fosfolipase A2 e da proteína quinase C com um potencial papel na transdução do sinal celular, inflamação, crescimento e diferenciação	<a href="#">ExoCarta_308</a>
-------	--	------------------------------

TSG101	Gene suscetibilidade tumoral 101 – acredita-se que participe no crescimento e diferenciação celular e atua como um regulador negativo de crescimento.	<a href="#">ExoCarta_7251</a>
--------	---	-------------------------------

Informação retirada de <https://www.systembio.com/products/exosome-research/exosome-detection/exo-check-exosome-antibody-array/> e <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, acessado em 15/01/2019

### Anexo III – Comparação das concentrações das amostras de Rim, Bexiga e Próstata

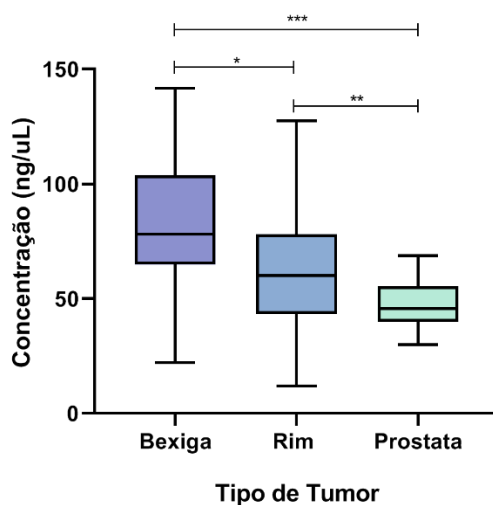


Figura 1 - Comparação da distribuição das concentrações entre tipo de tumor. Para esta comparação foram usados os valores das concentrações do DNA extraído a fresco (T0)(N=104). Os valores médios de concentração foram 81.83 ng/μL para as amostras de DNA de Bexiga, 62.40 ng/μL par as amostras de Rim e 46.88 ng/μL para as amostras de prostata. Os grupos foram comparados utilizando o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. \*P=0.0053; \*\*P=0.0432; \*\*\*P<0.0001

Além de haver uma grande diferença entre as amostras da coleção Bioprost e as amostras da coleção de Tumores, há também uma diferença significativa entre as amostras de rim e de bexiga, dentro da coleção de Tumores (figura 1).

Do meu ponto de vista uma explicação possível para isto acontecer poderá estar relacionada com o nível de resposta imunológica e com a leucocitose (neutrofilia) associada ao cancro e que poderá variar entre o tipo de tecido afetado. De qualquer forma é uma diferença que poderá ter algum interesse em estudar.



## Anexo IV – Resumo do Poster “Biobanco-iMM quality assurance-Factors Involved”

**Introduction:** Easy access to human biological samples and respective detailed clinical information is pivotal to the progress of medical knowledge. The concept of biobank was born in this context, as an infrastructure composed by collections of biological samples and respective clinical information.

The impact of biobanks is measured by the presence of good quality samples associated with clinical information. Biobanco-iMM, so far, has more than 156000 samples from more than 15000 donors.

Regarding this, we proposed ourselves to determine and report the results of samples quality control and processes conducted in our biobank where we perform quality controls of nucleic acids and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) extracted from blood samples.

**Methods:** PBMC isolation was performed by using two protocols: classic Ficoll and Leucosep tubes. DNA was extracted from fresh and frozen blood samples. Its integrity was confirmed using agarose gels. DNA purity and concentration were obtained by measuring A260/A280 ratios by Infinite 200 NanoQuant.

**Results:** For PBMCs isolation previous results showed a cell recovery rate of 36% but we are still waiting for further results. For DNA fresh samples obtained A260/A280 ratios of 1.9 and concentrations of 51 ng/μl (n=1182) and stored samples (n=59 stored between five and ten years) had A260/A280 ratios of 1.8 and concentrations of 24.7 ng/μl.

**Conclusion:** These results clearly indicate that our PBMC and DNA stored samples meet the required quality standards. However long term storage of whole blood represents a significant loss of yield regarding nucleic acids extraction.